

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND  
Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituut

Hans Priks

**Polüürrool mikrobioloogiliste kütuseelementide  
elektroodimaterjalina**

Magistritöö (30 EAP)

Juhendaja: Dr. Tarmo Tamm

Tartu 2016

## **Polüpürrool mikrobioloogiliste kütuseelementide elektroodimaterjalina**

Maailma rahvaarvu juurdekasvuga suureneb inimkonna energiavajadus ja toodetav reovee kogus. Käesoleval ajal kulub reoveepuhastites orgaaniliste ainete ümbertöötlemisele märkimisväärselt energiat. Mikrobioloogilised kütuseelemendid (MKE) on bioreaktorid, mis muundavad orgaaniliste ühendite keemiliste sidemete energia elektrienergiaks, kasutades reaktsioonide katalüüsiks mikroorganisme. Magistritöö eesmärgiks oli sünteesida ja viia läbi katse testimaks erinevaid polüpürrool-materjale MKE elektroodimaterjalina. Käesolevas töös töötati välja kaks uut meetodikat polüpürrool-elektroodide valmistamiseks ning võrreldi neid tüüpiliselt kasutatavate materjalidega. Sünteesitud polüpürrool-süsinikvilt komposiit näitas teistest kasutatud materjalidest ülekaalukalt paremaid tulemusi.

**Märksõnad:** polüpürrool, mikrobioloogiline kütuseelement, hüdrogeel, polüpürrool-süsinikvilt komposiit

**CERCS koodid:** P250 Tahke aine: struktuur, termilised ja mehaanilised omadused, kristallograafia, phase equilibria. P260 Tahke aine: elektrooniline struktuur, elektrilised magneetilised ja optilised, omadused, ülijuhtivus, magnetresonants, spektroskoopia. P330 Bioenergeetika.

### **Polypyrrole as a microbial fuel cells electrode material**

With the increase of World population, the energy demand and production of wastewater will increase. Presently, the recycling of organic matter in sewage plants consumes a considerable amounts of energy. Microbial fuel cells (MFC) are bioreactors that convert organic compounds chemical bond energy into electric energy, using microorganisms to catalyze the reaction. The aim of this master thesis was to synthesize and test different polypyrrole materials for MFC electrodes. In this work, two new methodologies were developed for making polypyrrole electrodes, the results were compared to the typically used materials. Synthesized polypyrrole-carbon felt composite showed far better performance than the other tested materials.

**Keywords:** polypyrrole, microbial fuel cell, hydrogel, polypyrrole-carbon felt composite

**CERCS codes:** P250 Condensed matter: structure, thermal and mechanical properties, crystallography, phase equilibria. P260 Condensed matter: electronic structure, electrical, magnetic and optical properties, superconductors, magnetic resonance, relaxation, spectroscopy. P330 Bioenergetics.

# SISUKORD

SISUKORD.....	4
Lühendite ja enim kasutatud mõistete loetelu.....	6
SISSEJUHATUS.....	7
Motivatsioon.....	7
Käesoleva töö eesmärk.....	9
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	10
1.1 Konventsionaalsed kütuseelemendid (KKE).....	10
1.2 Mikrobioloogiline kütuseelement (MKE).....	11
1.2.1 MKE tööpõhimõte.....	11
1.2.2 Rakuhingamine.....	12
1.2.3 Ekstratsellulaarne elektroni ülekanne.....	13
1.2.4 Shewanella MR-1.....	14
1.2.5 MKE efektiivsus.....	15
1.2.6 MKE arhitektuurid.....	18
1.2.7 Tüüpilised elektroodimaterjalid.....	19
1.2.8 MKE eelised ja puudused.....	19
1.3 Polüürrool.....	20
1.3.1 PPy-hüdrogeel.....	20
2 EKSPERIMENTAALNE OSA.....	22
2.1 MKE konstruktsioon.....	22
2.2 Rakukultuur.....	23
2.3 Kemotaksis.....	23
2.4 Kasutatud lahused.....	23
2.4.1 Anoodi kamber.....	23
2.4.2 Katoodikamber.....	24
2.5 Elektroodide valmistamine.....	25
2.5.1 Anoodide valmistamine.....	25
2.5.1.1 PPy-hüdrogeeli süntees ja läbivoolu katsed.....	25
2.5.1.2 PPy keemiline sadestamine süsinikvildile.....	26
2.6 Tsükliline voltamperomeetria (CV) meetodika.....	27
2.7 PPy-modifitseeritud süsinikvildi skaneeriv elektronmikroskoopia.....	27
2.8 Katoodi valmistamine.....	28
2.9 MKE kokkupanek ja steriliseerimine.....	28
2.10 MKE inokulatsioon.....	29
2.11 MKE Mõõtmismetoodika.....	29
2.12 Mikroorganismide visualiseerimine.....	29
2.12.1 PPy-hüdrogeeli visualiseerimine.....	29
2.12.1.1 PPy-hüdrogeeli viilutamine mikrotoomiga.....	30
2.12.1.2 Visualiseerimine fluorestsentsmikroskoobiga.....	30
2.12.1.3 Visualiseerimine skaneeriva elektronmikroskoobiga (SEM).....	30
3 TULEMUSED JA ANALÜÜS.....	32
3.1 PPy-hüdrogeeli sünteeside ja läbivoolu katsed.....	32
3.2 PPy-modifitseeritud süsinikviltide süntees.....	34
3.3 PPy-modifitseeritud süsinikviltide elektrokeemiliste omaduste võrdlus.....	37
3.4 Kemotaksise katsed.....	37
3.5 Mikrotoomiga viilutatud PPy-hüdrogeeli visualiseerimine.....	38
3.6 MKE tootlikkuse analüüs.....	39
KOKKUVÕTE.....	42

<b>KASUTATUD KIRJANDUSE LOETELU .....</b>	<b>43</b>
<b>Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks .....</b>	<b>48</b>

## **Lühendite ja enim kasutatud mõistete loetelu**

1K-MKE – ühekambriline MKE

2K-MKE – kahekambriline MKE

APS – ammoniumpersulfaat

CV – tsükliline voltamperomeetria

KKE – konventsionaalne kütuseelement

LB – Luria-Bertani

MKE – mikrobioloogiline kütuseelement

NaDBS – naatrium-dodetsüülbenseensulfonaat

PBS – fosfaat-puhverdatud soolalahus

PFA – paraformaldehüüd

POM – Fosfovolframhappe hüdraat

PPy – polüpürrool

Py – pürrool

SEM – skaneeriv elektronmikroskoop

TJP – tühijooksupinge

# SISSEJUHATUS

## Motivatsioon

Maailma rahvaarvu juurdekasvuga [1] suureneb inimkonna energiavajadus ja toodetav reovee kogus. Kaasaegne elukorraldus ja energiamajandus tuginevad enamjaolt fossiilsete kütuste kasutamisel, mis põhjustavad keskkonna saastumist ning kliima soojenemist. Nende taastumatute energiaressursside varud on piiratud. Energiakriisi vältimine ning globaalseid kliimamuutusi põhjustavate kasvuhoonegaaside emissiooni vähendamine tingivad vajaduse alternatiivsete ja keskkonnasõbralike taastuvenergia ressursside järele.

Käesoleval ajal kaob reoveepuhastites orgaaniliste ainete ümbertöötlemisel märkimisväärselt energiat. Ameerika Ühendriikide näitel tarbis orgaanilise reovee käitlemine aastal 2006 ligikaudu 3% kogu elektritoodangust [2]. Samas sisaldab töödeldav majapidamis-, tööstus- ja loomade reovesi kokku umbes  $1,5 \times 10^{11}$  kilovatt-tundi (kWh) potentsiaalset energiat ( $\sim 17$  GWh) [3]. Kasutades ära osagi sellest energiast, väheneks reovee puhastusele kuluv energia. Põllumajanduse harjumusi muutes on võimalik energia tootmisele suunata lisaks 1,34 miljardit tonni biomassi, mis on enam kui 600 GW [4].

Erinevad orgaanilised jäätmed võivad olla rikkalikuks ressursiks energia tootmisel, seda võimekuse korral arendada efektiivseid meetodeid sellise energia rakendamiseks. Alternatiivselt on võimalik biomassis olevat energiat kasutada teiste kasulike keemiliste ühendite valmistamiseks, nagu näiteks biokütused ja industriaalsed kemikaalid, mis hetkel vajavad tootmiseks nii energiat kui ka substraate.

Suhteliselt hiljuti on väljatöötatud mikroobide elektrokeemilised tehnoloogiad, mis kasutavad erinevate reaktsioonide katalüüsiks mikroorganisme, nagu näiteks mikrobioloogilised kütuseelemendid (MKE), mis genereerivad jäätmete biomassist elektrienergiat. Mikroorganism oksüdeerib orgaanilist ainet ning vabastab elektrone, võimaldades genereerida elektrivoolu, mida on võimalik kasutada elektri, biokütuste või muude kemikaalide tootmiseks. Bakterid, kes suudavad oma rakumembraanist elektrone välja transportida mittelahustuvatele elektron akseptoritele, kannavad inglise keeles nime: "*exoelectrogens*". Samad bakterid on suutelised oma elektrone

loovutama ka elektrootidele. Tānaseks on leitud hulganisti baktereid, kes omavad sellist vōimet, kuid enim uuritud on Geobakteri ja Shewanella liiki kuuluvad mikroorganismid [5].

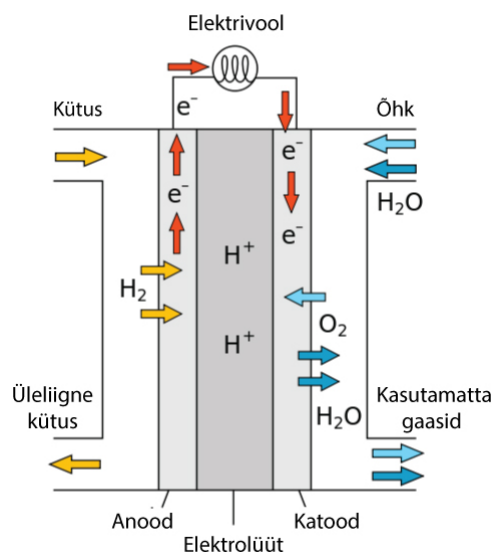


## **Käesoleva töö eesmärk**

Käesoleva magistritöö laiemaks eesmärgiks on mikrobioloogiliste kütuseelementide, kui potentsiaalse energiaallika tutvustamisega seotud kompetentsi tekitamine Eesti bioenergeetikas. Konkreetsem eesmärk on sünteesida ja testida erinevaid polüpürroolil põhinevaid materjale MKE elektrodide valmistamiseks.

# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

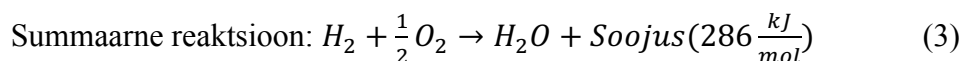
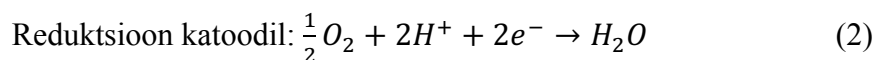
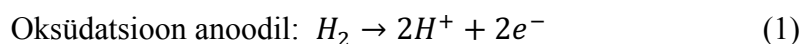
## 1.1 Konventsionaalsed kütuseelemendid (KKE)



Joonis 1. Polümeerelektrolüüt-kütuseelemendi ehituse ja talitluse skeem (kohandatud:

[http://en.wikipedia.org/wiki/File:Solid\\_oxide\\_fuel\\_cell.svg](http://en.wikipedia.org/wiki/File:Solid_oxide_fuel_cell.svg))

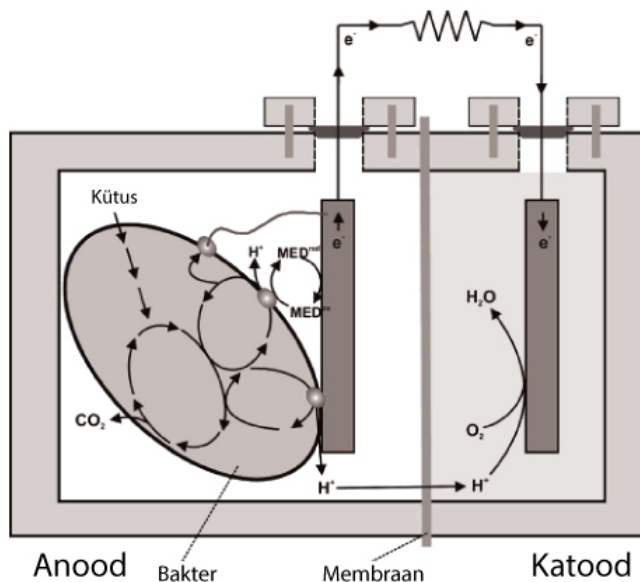
Kütuseelemente kirjeldatakse sageli kui seadmeid, mis otseselt muundavad keemilise energia elektrienergiaks. Need toimivad ilma põletusprotsessita ning erinevalt patareidest ei vaja laadimist. Samas vajavad kütuseelemendid pideva voolu tootmiseks katkematult kütust ja oksüdeerijat. Kütus – redutseerija (nt vesinik) - oksüdeeritakse anoodil, mille tulemusel saadakse elektronid, mis juhitakse välise elektriabla kaudu katoodile, kus need redutseerivad oksüdeerijat (nt hapnik) (Joonis 1.). Abiootilised kütuseelemendid vajavad üldjuhul kalleid ja taastumatuid katalüsaatoreid (nt plaatina). Vesinik-kütuseelemendi oksüdatsiooni - reduktsiooni poolreaktsioonid anoodil ja katoodil kulgevad järgnevalt:



Kütuseelementide eelisteks on nende kõrge efektiivsus, madal või isegi nullsaaste, vaikne töö ja vähem liikuvaid osi. Töökindluse saavutamiseks lisatakse pumbad ja ventilaatorid, et hoida ringluses jahutusvedelik ning reagent-gaasid [10,11].

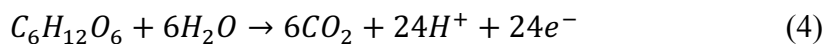
## 1.2 Mikrobioloogiline kütuseelement (MKE)

### 1.2.1 MKE tööpõhimõte



Joonis 2. MKE ehituse ja talitluse skeem [20]

MKEd toimivad samadel põhimõtetel kui tavalised kütuseelemendid ja see on paljulubav biotehnoloogia, mis on võimeline muundama orgaanilisi substraate heitvees (nt olmereovees, loomakasvatuse reovees, nõrgvees ja uriinis) elektrienergiaks [12-19]. Antud protsess toimib tänu elektroaktiivsetele mikroorganismidele, kes koloniseerivad anoodi ning lagundavad seal orgaanilisi substraate. Selle tulemusena genereerivad nad elektrone, mis välise elektriiahela kaudu viiakse katoodile [20]. Glükoosi või sarnaste ainete oksüdeerimisel vabastavad bakterid süsinikdioksiidi, elektrone ja prootoneid vastavalt reaktsioonile:



Prootonid rändavad läbi katioonvahetus membraani samal ajal, kui elektronid liiguvad anoodilt välise takistuse kaudu katoodile, kus mõlemad reageerivad hapnikuga vastavalt reaktsioonile (2) (joonis 2.). Katoodil võib kasutada teisi oksüdeeriaid, näiteks on uuritud nitraatide, fumaraadi ja klooreritud ühendite redutseerumist [21-24]. Samuti saab rakendada metalle (nt  $Cr^{6+}$ ,  $Mn^{7+}$  ja  $Fe^{3+}$ ) elektroni akseptoritena ja selle tulemusena on võimalik need reoveest eemaldada [25-27].

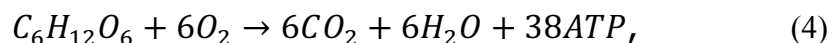
### 1.2.2 Rakuhingamine

Elavad organismid vajavad energiat, et areneda, kasvada ning funktsioneerida. Rakuhingamine on rakkudel tõhusaim viis kätte saada toidus talletatud energia.

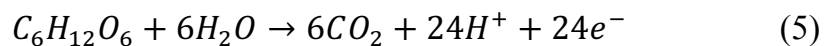
Rakuhingamine koosneb kolmest protsessist:

1. Glükolüüs
2. Tsitraaditsükkel
3. Hingamisahela reaktsioonid

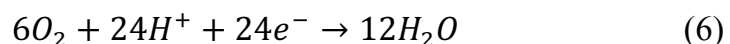
Tegemist on raku sisese kataboolse rajaga, mille tulemusena muundatakse toitainete biokeemiline energia energiaks, mis talletatakse adenosiintrifosfaadis (ATP) ning lisaks vabanetakse tekkinud jääkidest. Taimede ja loomade hingamise aluseks on hapnik, mis mitmeetapilise hingamisahela viimases osas üleliigsete elektronidega redutseeritakse. Bakterite energiasüsteem on tunduvalt paindlikum ja paljud neist on võimelised kasutama ka teisi elektroni akseptoreid. Summaarse glükoosi metabolismi reaktsiooni saab välja kirjutada järgnevalt:



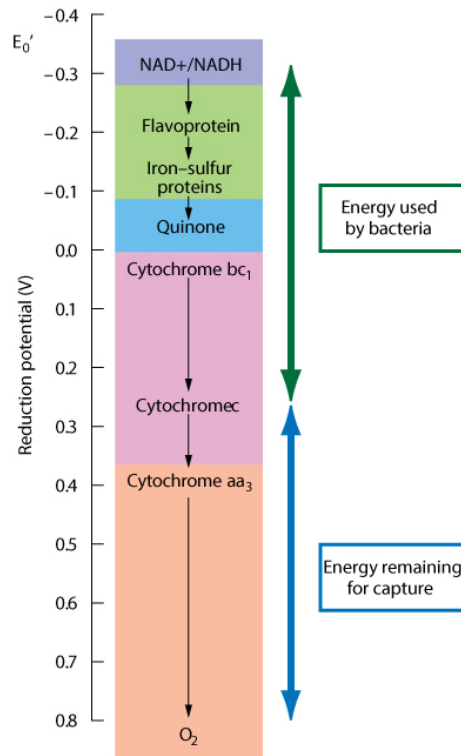
mille osadeks on glükoosi oksüdatsioon:



ja hapniku reduktsioon:

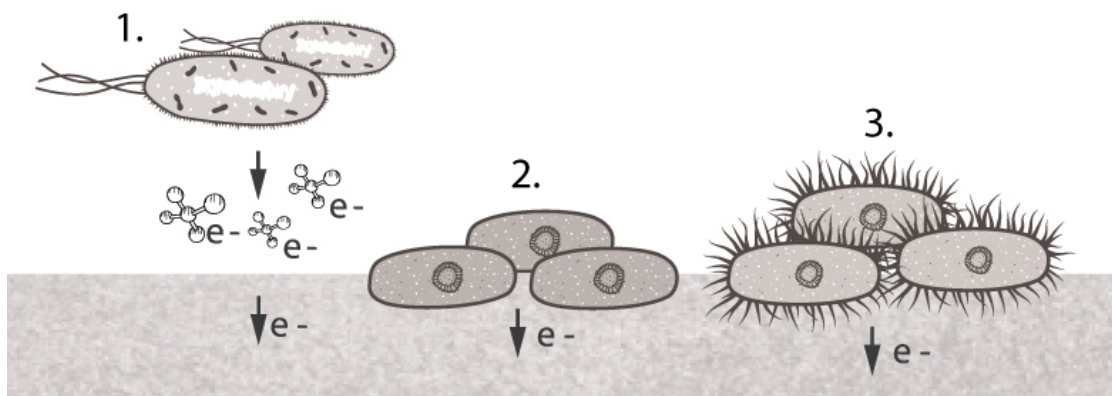


Kogu energia, mida saab püüda, on proportsionaalne potentsiaalide vahega elektronkandja, mis loovutab elektronid hingamisahelale (nt nikotiinamiidadeniindinukleotiid) ja terminaalse elektroni akseptori (nt hapnik) vahel [28]. Osa sellest energiast kasutab mikroorganism ning ülejäänuga saab genereerida MKE-s voolu (Joonis 3.).



**Joonis 3.** Hingamisahel näitab kuidas püütav energia MKE-s sõltub kohast, kus elektronid väljuvad ahelast [29].

### 1.2.3 Ekstratsellulaarne elektroni ülekanne



**Joonis 4.** Mikroorganismide ekstratsellulaarne elektroni ülekanne

Mikroorganismid suudavad oma elektrone anoodile loovutada läbi mediaatorite (Joonis 4,1), otsese kontakti (2) või elektrit juhtivate nanojuhtmete (3) [5].

- 1) Mediaatoriga MKE-s on anoodi kambris bakterid koos toitainega, kuhu on ka lisatud mingisugust elektrone transportivat kemikaali (nt metüülsinine), mis vahendab elektrone bakteritelt anoodile. Sellised MKE-d saavad kasutada

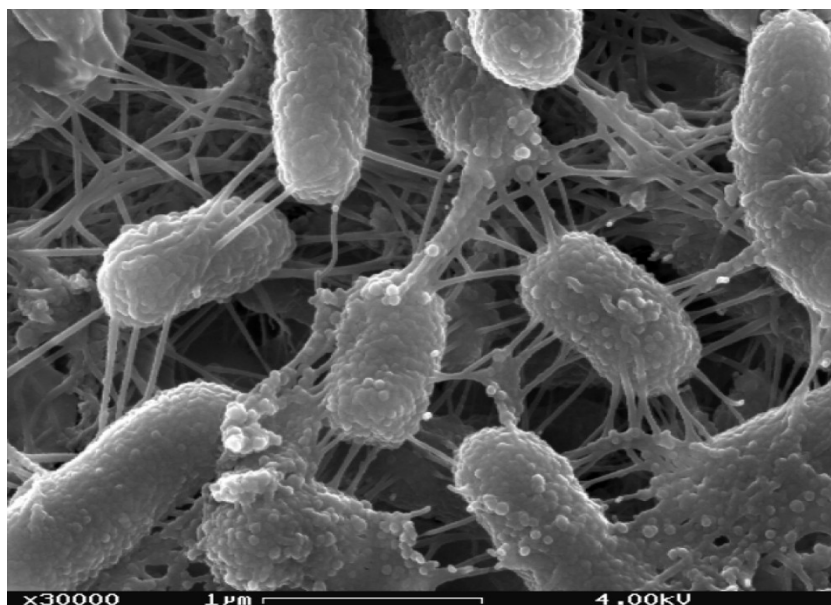
peaaegu igat tüüpi baktereid, kuid palju elektrone ja energiat läheb kaduma, mis drastiliselt piirab kütuseelemendi efektiivsust. Alles hiljuti arvati, et MKE-s on võimatu toota kasulikku voolu ilma eksogeensete mediaatoriteta, mis on toksilised, kulukad ja ebastabiilsed [30]. Nüüdseks on avastatud, et osad mikroorganismid suudavad ise toota mediaatoreid [31], kuid elektron süstikute aeglase difusiooni tõttu ei ole siiski võimalik genereerida kõrgeid voolusid.

- 2) Otsese kontakti korral bakteri välismembraanis olevad tsütokroomid interakteeruvad tahke pinnaga ning loovutavad elektrone. Sellest tulenevalt ei suuda need mikroorganismid ulatuslikke kolooniaid luua, sest kõik bakterid ei saa elektroodiga kontakti. Seda tüüpi ülekande puhul on maksimaalsed voolutihedused peaaegu kaks suurusjärku väiksemad kui kõige kõrgemad voolutihedused teistes MKE-des [32].
- 3) Bakterite nanojuhtmed võimaldavad kiiret elektronide ülekannet oksüdeeritud metallidele või elektroodidele. Nanojuhtmed on välismembraani ja periplasmaatilise ruumi laiendid, mis sisaldavad hingamisahelaga seostatud tsütokroome. On leitud, et ainult välise juhtiva maatriksi abil on võimalik MKE-s saavutada kõrgeid voolutihedusi ja madalaid anoodi potentsiaali kadusid [33,34].

#### 1.2.4 *Shewanella* MR-1

$\Gamma$ -proteobakter *Shewanella oneidensis* MR-1 (ATCC® 700550<sup>TM</sup>) avastati ja isoleeriti esmakordselt aastal 1988 Dr. Kenneth Nealsoni poolt New York Lake Oneidast [35]. See koloonia on üks kõige sagedamini kasutatud baktereid MKE-des, need on läbipaistvad ning lõheroosad. MR-1 on kuulus oma võime poolest redutseerida tahkeid substraate ja kasvada nii aeroobsetes kui ka anaeroobsetes tingimustes. Tavaliselt kasutab ta hapniku, et vabaneda oma üleliigsetest elektronidest. Anaeroobsetes tingimustes on tal võime kasutada elektroni akseptorina erinevaid metalle.

*Shewanella* MR-1 suudab loovutada oma elektrone kasutades kahte erinevat meetodit. Ta toodab riboflaviini ja riboflaviin-5'fosfaati, mis töötavad kui elektroni süstikud [31]. Lisaks on leitud, et tal on ka elektrit juhtivad nanojuhtmed [36,37], mis on välismembraani ja periplasmaatilise ruumi laiendid [33] (Joonis 5.) .



**Joonis 5. SEM mikrograaf baktereid ühendavatest nanojuhtmetest**  
(<http://bluetechblog.com/2010/06/15/make-electricity-not-sludge/>)

*S. oneidensis* omab võimet liikuda anaeroobsete elektron akseptorite suunas, kasutades, kas kemotaksist või energia taksist. See viitab sellele, et bakter, kellel on mitmekülgne ja ulatuslik hingamine võib kasutada erinevaid mehhanisme, et leida kasvu soodustav keskkond. Välja on pakutud, et *S. oneidensis*el on kaks erinevat mehhanismi Fe(III) ja Mn(III) mineraalsete pindade lokaliseerimiseks. Esiteks on ta võimeline reageerima lahustunud metallide oksüdeeritud vormidele, kasutades energia taksist. Teiseks reageerib ta kemotaksselt elektroni akseptori puudumisel nende metallide redutseeritud vormidele. Seega võib *S. oneidensis* saada konkurentsieelise teiste metalle taandavate bakterite ees anoksilistes keskkondades mineraalsete pindade koloniseerimisel [38].

### 1.2.5 MKE efektiivsus

MKE-s genereeritakse elektrit juhul, kui üldine reaktsioon on termodünaamiliselt soodne. Reaktsiooni saab hinnata Gibbsi vabaenergia seisukohalt, mise väljendab reaktsioonist saadavat maksimaalset tööd ning seda arvutatakse järgnevalt:

$$\Delta G = \Delta G^0 + RT \ln(\Pi), \quad (7)$$

kus  $\Delta G$  on Gibbsi vabaenergia konkreetsetes tingimustes ning ühikuks on džaul (J).  $\Delta G^0$  on Gibbsi vabaenergia standard tingimustel, R on universaalne gaasi konstant ( $8.31447 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ) ja T (K) on absoluutne temperatuur.  $\Pi$  (ühikuta) on reaktsiooni

jagatis, mis kõige üldisemal kujul avaldub kui reaktsioonisaaduste aktiivsuste korrutis jagatud reaktsiooni lähteainete aktiivsuste korrutisega. MKE arvutusteks on kõige mugavam reaktsiooni hinnata elektromotoorjõu ( $E_{mj}$  / EMJ) seisukohast. Elemendi  $E_{mj}$  (V) on määratletud katoodi ( $E_{kat}$ ) ja anoodi ( $E_{an}$ ) potentsiaalide vahega vastavalt valemile:

$$E_{mj} = E_{kat} - E_{an} \quad (8)$$

$E_{mj}$  on seotud elemendi poolt toodetud tööga,  $W$  (J),

$$W = E_{mj}Q = -\Delta G \quad (9)$$

$$Q = nF, \quad (10)$$

kus  $Q$  on reaktsioonis ülekantav laeng ja seda väljendatakse kulonites (C), mis on omakorda määratletud reaktsioonis vahetatud elektronide arvuga. Elektronide arv reaktsiooni kohta moolides kannab tähistust  $n$  ja  $F$  on Faraday arv ( $9.64853 \times 10^4$  C/mol). Ühendades võrrandid (9) ja (10) saame:

$$E_{mj} = -\frac{\Delta G}{nF} \quad (11)$$

Kui kõik reaktsioonid on standard tingimustel,  $\Pi = 1$ , siis

$$E_{mf}^0 = -\frac{\Delta G^0}{nF}, \quad (12)$$

kus  $E_{mf}^0$  (V) on elemendi EMJ standard tingimustel. Kasutades eespool väljatoodud võrrandeid, saab avaldada potentsiaalide seisukohalt üldise võrrandi:

$$E_{mj} = E_{mj}^0 - \frac{RT}{nF} \ln \Pi \quad (13)$$

Võrrandi (13) eeliseks on, et see on positiivne soodsa reaktsiooni jaoks ja annab reaktsiooni otsese EMJ väärtuse. Kalkuleeritud EMJ annab MKE pinge ülempiiri, mis on termodünaamiline väärtus ja ei võta arvesse sisekadusid. MKE tühijooksupinge (TJP) on pinge, mida saab mõõta mõne aja möödudes voolu puudumisel (avatud elektri ahela korral). Teoreetiliselt peaks TJP olema võrdne kütuseelemendi EMJ-ga. Maksimaalne MKE EMJ on teoreetiliselt suurusjärgus 1.1 V, kuid mõõdetud MKE TJP-d erinevate kadude tõttu on tunduvalt madalamad. Maksimaalsed seni saavutatud MKE TJP-d jäävad 0.8 V lähedale ja voolu genereerimisel alla 0.62 V-i. Üldiselt



mõõdetud MKE pinge ja EMJ vahe nimetatakse ülepingeeks ning see on anoodi, katoodi ülepinged ja süsteemi oomiliste kadude summa.

$$E_{element} = E_{emj} - (\Sigma\eta_a + |\Sigma\eta_k| + IR_{\Omega}), \quad (14)$$

kus  $\Sigma\eta_a$  ja  $|\Sigma\eta_k|$  on anoodi ja katoodi ülepinged ning  $IR_{\Omega}$  on kõikide oomiliste kadude summa, mis on võrdeline genereeritud voolu ( $I$ ) ja süsteemi oomilise takistusega ( $R_{\Omega}$ ). Elektrodide ülepinged on üldiselt voolust sõltuvad. Kadusid MKE-s võiks liigitada järgnevalt: (1) oomilised kaod, (2) aktivatsiooni polarisatsiooni kaod, (3) bakterite metaboolsed kaod, (4) kontsentratsioonipolarisatsiooni kaod. MKE mõõdetud pinge on tavaliselt voolu lineaarne funktsioon ja lihtsustatult saab seda kirjeldada järgneva võrrandi abil:

$$E_{element} = OCV - IR_{sise} \quad (15)$$

- 1) **Oomilised kaod.** MKE oomilised kaod hõlmavad elektronide liikumisele mõjuvat takistust läbi elektrodide ja kontaktide. Samuti tuleb arvestada prootoni liikumisele mõjuvaid takistusi läbi membraani (kui üldse kasutatakse) ja anoodi- ning katoodiruumi elektrolüütide. Oomilisi kadusid saab vähendada minimeerides elektrodide vahekaugusi, kasutades väikse takistusega membraane, kontrollides põhjalikult kontakte ja kui on otstarbekas, siis suurendada lahuse juhtivust piirini, mida bakter suudab taluda.
- 2) **Aktivatsiooni polarisatsiooni kaod.** Aktivatsiooni polarisatsioon on seotud reaktsiooni läbiviimiseks vajamineva aktivatsioonienergiaga ning mängib olulist rolli väikeste voolutiheduste korral. Siia alla kuuluvad lähteainete adsorptsioon ja saaduste desorptsioon ning elektroni ülekande energiabarjäär. Madalaid aktivatsiooni kadusid saab saavutada, suurendades elektroodi pindala, elektroodi katalüüsi, töötemperatuuri ja muidugi rikkaliku bakteri koloonia olemasolul.
- 3) **Bakterite metaboolsed kaod.** Metaboolse energia genereerimiseks transpordivad bakterid substraadi elektrone madalalt potentsiaalilt läbi hingamisahela kõrgema potentsiaaliga elektroni akseptorile (nt hapnik). MKE-s on bakteri jaoks anood viimane elektroni akseptor ning selle potentsiaal määrab ära tema energia võidu. Mida suurem on substraadi redokspotentsiaali vahe anoodi potentsiaaliga, seda kõrgem on metaboolse energia kasu bakterile,

kuid seda madalam on maksimaalselt saavutatud MKE pinge. Sellest tulenevalt tuleb MKE pinge maksimeerimiseks tuleb anoodi potentsiaal hoida võimalikult madalal (negatiivne). Samas, kui see on liiga madal, siis elektronide transport võib pidurduda, sest substraadi kääritamine võib pakkuda mikroorganismile rohkem energiat.

- 4) **Kontsentratsioonipolarisatsiooni kaod.** Kontsentratsioonipolarisatsiooni kaod tekivad toitainete kontsentratsiooni või selle jaotumise probleemide tõttu. Need kaod tekivad kõrgetel laengutihedustel, kui jääkproduktide ja toitainete difusioon elektroodi pinnalt ja pinnale on limiteeritud. Selle tulemusena oksüdeeritud ja redutseeritud vormide suhe elektroodi pinnal suureneb, tuues kaasa potentsiaali kasvu. Katoodil võib tekkida sama probleem vastupidiselt ja potentsiaal langeb. Kontsentratsioonipolarisatsiooni kadusid saab vähendada parandades MKE disaini maksimeerides lahuse liikumine ja segunemine [20].

MKE jõudlust hinnatakse peamiselt läbi genereeritud võimsuse. Võimsus arvutatakse järgnevalt:

$$P = I E_{element} \quad (16)$$

Tavaliselt mõõdetakse pinget üle fikseeritud välise takisti ( $R_{väline}$ ) ja vool arvutatakse kasutades Ohmi seadust ( $I = E_{element} / R_{väline}$ ). Sellest tulenevalt arvutatakse võimsus järgnevalt:

$$P = \frac{E_{element}^2}{R_{väline}} \quad (17)$$

### 1.2.6 MKE arhitektuurid

Laialdaselt on uuritud kahte MKE konfiguratsiooni, kahekambrilist MKE-d (2K-MKE) ja ühekambrilist MKE-d (1K-MKE). 2K-MKE-s on anoodi ja katoodi kamber membraaniga üksteisest eraldatud (nt prootonvahetus-membraaniga) [39]. 1K-MKE-s on katoodi kamber eemaldatud ja katood on otseses kontaktis membraaniga. Mõnikord eemaldatakse isegi membraan ja elektroodid eraldatakse üksteisest separaatoriga ning mõlemad on kontaktis anoodi lahusega [15,40,41]. Membraani ja katoodi kambri eemaldamisega väheneb MKE sisetakistus ja suureneb hapniku juurdepääs katoodile. Sellest tulenevalt on saavutatud 1K-MKE-s kõrgemaid võimsusi kui 2K-MKE-s [41]. Membraani eemaldamisega võib samas tekkida ka probleem, et

hapnik difundeerub anoodiruumi lahusesse ja sellest tulenevalt langeb ka MKE efektiivsus [41].

### **1.2.7 Tüüpilised elektroodimaterjalid**

MKE anoodid peavad olema juhtivad, keemiliselt stabiilsed ja bioühilduvad. Kõige mitmekülgsem anoodi materjal on süsinik, saadaval on kompaktsed tahvlid, vardad, vildid, riided, paberid, harjad, graanulid jne. Nanotorud on oma hea juhtivuse ja suure eripinna tõttu väga huvitav elektroodi materjal, kuid valesti kasutades mõjuvad need bakteritele tsütotoksiliselt [42].

Katoodid peavad olema juhtivad ja keemiliselt stabiilsed. Tavaliselt kasutatakse katoodi materjalina samuti süsinikku. Alles hiljuti olid katoodina väga levinud süsinik-plaatina komposiitelektroodid, kuna plaatina on parim hapniku redutseerimise katalüsaator. Nüüdseks on leitud, et aktiivsüsi on paljutootav alternatiiv plaatinalle ning sellega on saavutatud peaaegu samasugused voolutihedused [43,44].

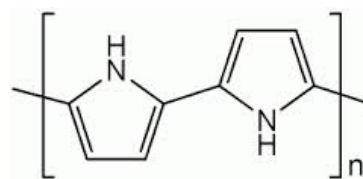
### **1.2.8 MKE eelised ja puudused**

Üldiselt on MKE-l kaks peamist eelist KKE-de ees. Nendeks on katalüsaator ja kasutatud energiaallikas. KKE kasutab katalüsaatorina kalleid materjale nagu näiteks plaatina, mis moodustab olulise osa üldkuludest. MKE kasutab katalüüsiks mikroorganisme, kes on sisuliselt tasuta ja selle asemel, et kasutada vesinikku või teisi kõrgkvaliteetseid süsivesinikke, sobivad energia allikaks erinevad bioloogilised materjalid ja jäätmed. Testimistel on leitud, et bakterid on väga vastupidavad ning suudavad ellu jääda äärmuslikes pH, temperatuuri ja soolsuse tingimustes. Katalüsaatoriks on elusate rakkude kolooniad, kes on võimelised end uuendama.

MKE-de testid näitavad samuti mõningaid nõrku külgi. Kõige ilmsem puudus on seni saavutatud madal voolutihedus. KKE-d saavutavad voolutiheduse suurusjärgus 1 A/cm<sup>2</sup>, samas MKE eksperimentidel jääb tulemus 1 mA/cm<sup>2</sup> lähedale. Teiseks probleemiks on see, et industriaalsed MKE-d vajavad hooldust ja ei ole piisavalt stabiilsed kommersialiseerimiseks. Usutakse, et palju täiustusi saab teha mitte ainult muutes MKE konstruktsiooni ja elektroodi materjale, vaid täiendavalt kasutades mikrobioloogiat konstrueerimaks võimekamaid baktereid [45].

### 1.3 Polüpürrool

Polüpürrool (PPy), mille struktuurivalem on välja toodud joonisel 6., on konjugeeritud polümeer, mis omab elektrilisi omadusi, kaasaarvatud elektrilist juhtivust. PPy sünteesitakse tavaliselt keemilistel või elektrokeemilistel meetoditel. Keemilist sünteesi kasutatakse üldjuhul siis, kui vajatakse suures koguses

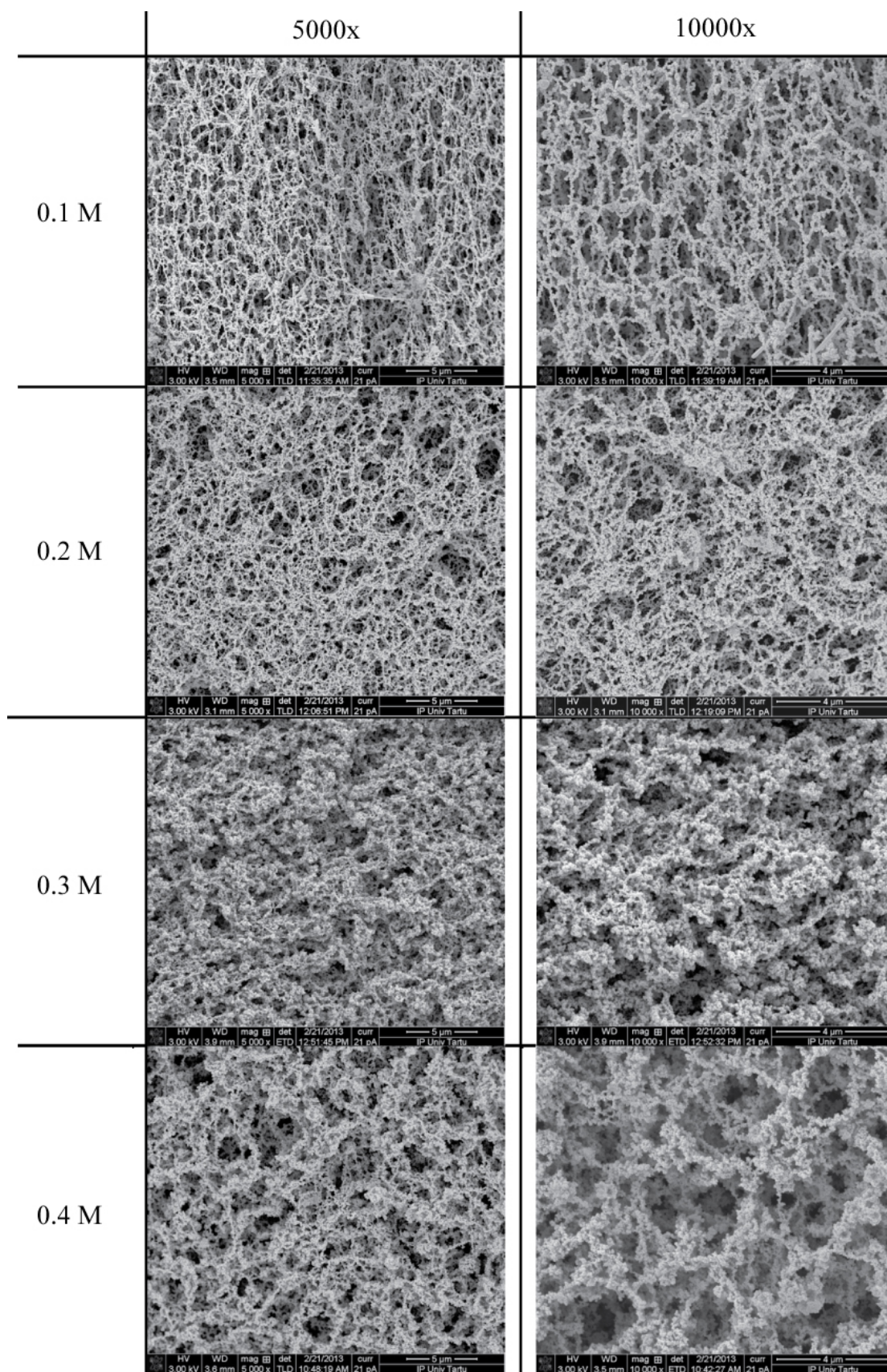


Joonis 6. PPy struktuurivalem

materjali või ei ole võimalik kasutada juhtivat aluspinda. Metoodika seisneb tugeva oksüdeerija (tavaliselt  $\text{FeCl}_3$ ) segamisel Py monomeere sisaldava lahusega. Elektrokeemilist sünteesi eelistatakse teaduslikel eesmärkidel, kuna võimaldab ulatuslikku kontrolli materjali paksuse, geomeetria, dopantide ja muude tegurite üle. PPy on bioühilduv materjal, mida on alates 1990 laialdaselt uuritud rakkude kasvu substraadina *in vitro* mudelites. Lisaks on uuritud ka implantaatide mõju *in vivo* loomudelites. Need PPy kiled on tavaliselt elektrokeemiliselt sünteesitud elektroodi pinnale (nt indiumtinaoksiid või kuld), kuhu samaaegselt lisatakse inertseid dopante või bioloogiliselt aktiivseid molekule [46].

#### 1.3.1 PPy-hüdrogeel

Puhas PPy-hüdrogeel avastati Rauno Temmeri poolt aastal 2012, kui ta jättis ööseks koos pesuveega seisma Py jääkidega elektrokeemilise sünteesi reaktori, ning järgneval päeval märkas, et sinna on moodustunud musta värvusega geeljas ollus. Lähemal uurimise määratles ta üheetapilise hüdrogeeli sünteesi metoodika parameetrid ning valmistas PPy-aerogeelid kasutades superkriitilist  $\text{CO}_2$  ekstraktsiooni. Erinevaid PPy kontsentratsiooniga aerogeelide karakteriseeriti kasutades elektrokeemilisi meetodeid ja SEM-i (joonis 7.). Uurimise tulemusena leiti, et tegemiste on suure eripinna ( $134.4\text{--}167.1 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ ) ja poorse materjaliga [47].

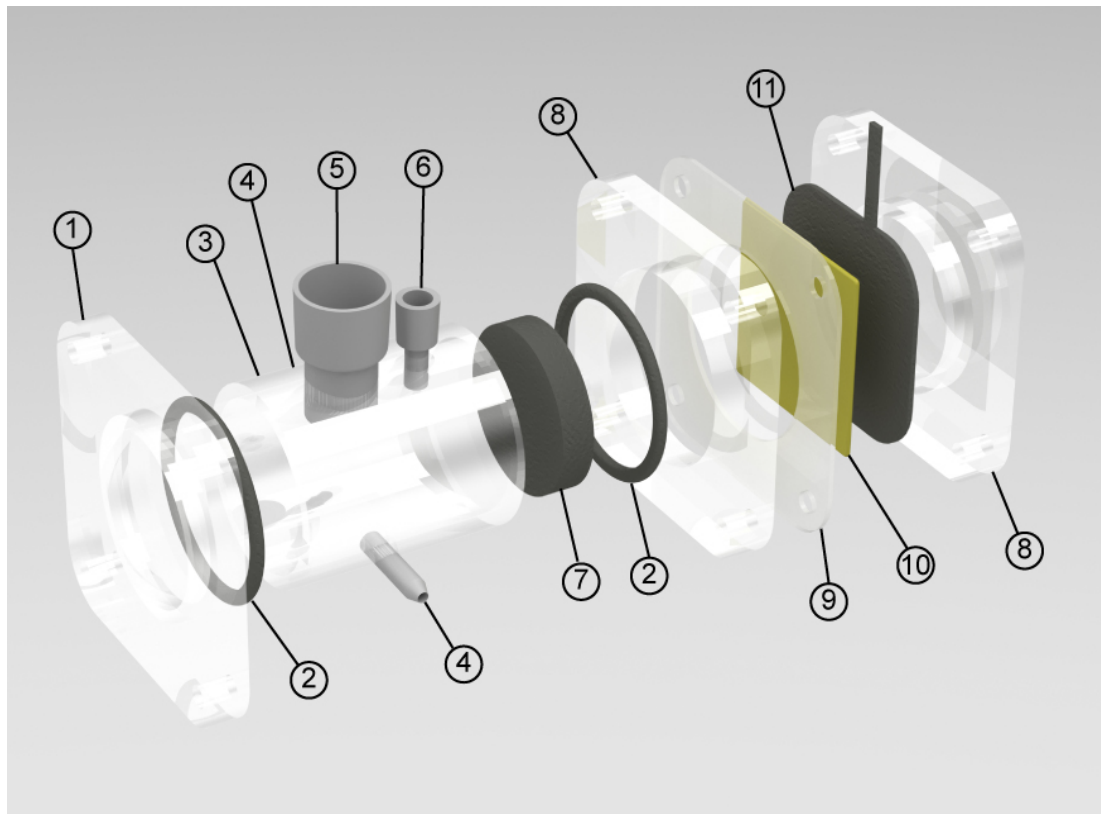


Joonis 7. SEM mikrograafid erineva kontsentratsiooniga PPy-aerogeelidest (sünteesinud ja pildistanud: Rauno Temmer)



## 2 EKSPERIMENTAALNE OSA

### 2.1 MKE konstruktsioon



**Joonis 8. MKE konstruktsioon**

Katsete läbiviimisel otsustati kasutada omavalmistatud ühekambrilisi kütuseelemente (**joonis 8.**). MKE disainimiseks rakendati 3D-modelleerimise tarkvara Solidworks (Student Edition 2015). Polükarbonaadist kütuseelementide valmistamiseks kasutati arvprogrammjuhtimisega freespink ja kooshoidmiseks happekindlaid keermelatte koos liblik-mutritega.

#### **MKE konstruktsiooni osad:**

- 1) Kinnine otsaplaat
- 2) Nitrüilkummist O-rõngas
- 3) Anoodi kamber (pikkus: 4 cm, sisediameter: 3 cm, ruumala: 28.27 cm<sup>3</sup>)
- 4) Sisse- ja väljalaske avad (lahuste pumpamiseks)
- 5) Suur kummikork (inokuleerimiseks)
- 6) Väike kummikork (kollektori kontakti väljatoomiseks)
- 7) Anood

- 8) Auguga membraani ja katoodi hoidja plaat
- 9) Polüdimetüülsiloksaan tihend (vältimaks lahuse lekkimist)
- 10) Membraan (CMI-7000S, eelnevalt töödeldud 24h 5% NaCl lahusega 40° C)
- 11) Katood

## 2.2 Rakukultuur

*Shewanella oneidensis* MR-1 (ATCC® 700550<sup>TM</sup>) telliti bioloogiliste ressursside ja standardite organisatsioonilt ATCC. Baktereid sisaldav tablett lahustati 5 milliliitris Luria-Bertani (LB) söötmes ja kasvatati 30° C ja 160 rpm'i juures 24 tundi. Seejärel külvati osa baktereid LB agarile. Ülejäänud bakterilahusest valmistati külmutamiseks krüoviaalidesse stokid. Igasse krüoviaali lisati 500 µl bakteri lahust ja 500 µl 30% glütserooli lahust ning paigutati –80° C külmikusse.

## 2.3 Kemotaksis

Uurimaks *Shewanella oneidensis* MR-1 kemotaksist, valmistati 0.4% agari kontsentratsiooniga LB petri tassid. Seejärel tehti poolvedelasse agarsöötmetesse pistekülv, millest ~1-2 cm kaugusele asetati raud(III)tsitraadi vesilahuses immutatud filterpaber. Peale külvi asetati petri tassid eksikaatorisse (~20° C), mis täideti argooniga. Bakterite kolooniaid pildistati 48 tunni möödumisel.

## 2.4 Kasutatud lahused

### 2.4.1 Anoodi kamber

Eksperimentides kasutati kahte erinevat söödet. Esimest meediumit kasutati MKE-de inokuleerimiseks ja teist elektri genereerimiseks (**Tabel 1.**). Inokuleerimiseks kasutati Luria-Bertani (LB) söödet, mis on toitainete, vitamiinide ja mikroelementide rikas ning võimaldab bakteritel vabalt paljuneda. Teine sööde pärsib mikroorganismide kasvu ning bakterid saavad keskenduda elektri genereerimisele.

**Tabel 1. Katsetes kasutatavate söötmete koostis**

Kemikaali nimi	Keemiline valem	Sööde	Sööde elektri
		inokuleerimiseks g/L	genereerimiseks g/L
Trüpton	-	10	-
Naatriumkloriid	NaCl	5	-
Pärmiekstrakt	-	5	1
Naatriumlaktaat	C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> O <sub>3</sub> -Na	-	11.23
Kaaliumfosfaat	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	0.77
Naatriumvesinikfosfaat	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	-	0.47
Ammooniumkloriid	NH <sub>4</sub> Cl	-	1.5
Kaaliumkloriid	KCl	-	0.1

Söötmete valmistamiseks võeti 1 L Pyrex-klaasist pudel, kuhu lisati ~400 ml destilleeritud vett ja magnetsegaja. Alustati segamist ning ükshaaval lisati kaalutud ühendid. Peale kemikaalide lisamist täideti pudel destilleeritud veega kuni ühe liitri märgini ja segati kõigi komponentide täieliku lahustumiseni. Seejärel võeti kümme puhast koonilist kolbi ja igaühte lisati 100 ml valmistatud lahust. Kolbide suudmed kaeti kahekordse fooliumiga ja lisati autoklaavimise indikaator kleebis. Lahuseid autoklaaviti 121°C juures 20 minutit. Seejärel eemaldati lahused autoklaavist ja lasti jahtuda.

#### 2.4.2 Katoodikamber

Lahuse valmistamiseks võeti 1 L Pyrex-klaasist pudel, kuhu lisati ~400 ml destilleeritud vett ja magnetsegaja. Alustati segamist ja ükshaaval lisati kaalutud kemikaalid (**Tabel 2.**). Peale ühendite lisamist täideti pudel destilleeritud veega kuni ühe liitri märgini ja segati kemikaalide täieliku lahustumiseni.



**Tabel 2. Katsetes kasutatava katoodi elektrolüüdi kompositsioon**

Kemikaali nimi	Keemiline valem	g/L
Naatriumvesinikfosfaat	$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	1.825
Kaaliumdivesinikfosfaat	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.35

## 2.5 Elektroodide valmistamine

### 2.5.1 Anoodide valmistamine

#### 2.5.1.1 PPy-hüdrogeeli süntees ja läbivoolu katsed

Puhas PPy-hüdrogeel on suhteliselt hiljuti avastatud ja veel vähe uuritud materjal. Enne antud tööd oldi PPy-hüdrogeeli sünteesitud ainult üheastmeliselt ning ei eksisteerinud kiiret meetodit, millega kaudselt hinnata, kas hüdrogeeli sisemuses olevad tühimikud on omavahel ühendatud või tiheda struktuuriga eraldatud. Seda infot peeti väga oluliseks, kuna ühenduste puudumisel on bakterite pääsemine ja söötme difusioon hüdrogeeli sisemusse oluliselt raskendatud. PPy-hüdrogeeli sünteesiks kasutati kahte meetodit: ühe- ja kaheastmelist sünteesi.

**1. Üheastmeline süntees.** Valmistati kaks võrdse ruumalaga vesilahust. Esimene oli oksüdeerija ammoniumpersulfaadi (APS) vesilahus ja teine sisaldas naatriumdodetsüülbenseenisulfonaati (NaDBS) ja pürrooli (Py) monomeere. Erinevate geelide sünteesiks varieeriti APS ja Py kontsentratsioone 0.1-0.4 M. Kõikide sünteeside jaoks oli summaarne NaDBS kontsentratsioon 0.1 M. Sünteesi käivitamiseks kallati lahused kokku ja segati magnetsegajaga senikaua, kuni lahus muutus tumehalliks ning seejärel valati soovitud anumasse, mis moodustas geeli vormi. Samuti katsetati ka geelide sünteesi 0° C juures. Valmisatud lahuseid jahutati 30 minutit krüostaadis (LAUDA Proline RP 1845) ja seejärel segati kokku. Peale segamist asetati saadud lahus uuesti 30 minutiks krüostaati. Olenevalt Py-APS kontsentratsioonist lahus geelistus 10 sekundi (0.4 M Py-APS) kuni 6 tunni (0.1 M Py-APS) möödudes.

**2. Kaheastmeline süntees.** Valmistati kolm vesilahust ruumalade suhtega 1/1/2.

- 1) 0.15 M APS
- 2) 0.15 M NaDBS ja 0.8 M Py
- 3) 0.125 M NaDBS ja 0,925 M APS

Esimeses etapis segati lahused 1 ja 2 magnetsegajaga kokku kiirusel 600 rpm. Magnetsegaja lülitati välja, kui lahus muutus tumehalliks. Anum kaeti parafilmiga ja lasti seista 3 tundi. Peale seda segati lahust kuni moodustunud geel oli muutunud dispersiooniks (liigne segamine vähendab geeli läbivoolavust) ja seejärel lisati lahus 3 ning segati 800 rpm-i juures 2-3 sekundit. Peale segamist kallati lahus soovitud anumasse. Summaarne lahuse kontsentratsioon geeli sünteesiks oli 0.4 M Py, 0.5 M APS, 0.1 M NaDBS. Sama meetodit kasutades on võimalik sünteesida ka erineva Py kontsentratsiooniga hüdrogeele.

Läbivoolu katseteks kasutati klaasist torusid pikkusega 131 mm ja sisediaameetriga 11,43 mm. Toru üks ots suleti parafilmiga ja kinnitati kleeplindi abil. Torudesse sünteesiti 5 ml geeli ja lahtine ots kaeti parafilmiga ning lasti seista 24h. Järgmisel päeval asendati alumine parafilm plastikust sõelaga ning torud asetati statiivi külge, otsad vesivanni. Torud täideti ultrapuhhta veega (Milli-Q+) ja iga tunni järel märgiti torule vee tase seni, kuni vesi oli peaaegu otsas. Niimoodi testiti igat hüdrogeeli kaks korda. Toru alumisele otsale mõjuv vedelikusamba rõhk ( $p = h * \rho * g$ ) oli ~1281 Pa.

#### **2.5.1.2 PPy keemiline sadestamine süsinikvildile**

Alternatiivina uudsetele ja tundmatu sobivusega PPy-hüdrogeelidele tekkis mõte parandada laialt levinud anoodimaterjali – süsinikvildi – omadusi PPy abil, selleks tuli keemiliselt süsinikvildile sadestada õhuke PPy kile. PPy sadestamiseks oli vaja eelnevalt saada süsinik kiudude pinnale võimalikult ühtlane oksüdeerivate omadustega soola kiht. Soolad valiti nende oksüdeerivate, kemotaktiliste ning süsiniku pinnale adsorbeerumise omaduste järgi. Katsetes kasutatava süsinikvildi pinda karestati, hoides seda 24h kontsentreeritud lämmastikhappes. Seejärel alustati katseid soola kihi sadestamiseks. Enne PPy sadestamist oli vaja leida sobivad soolade ja solventide vahekorrad, mis suudaks katta võimalikult ühtlaselt vildi süsinikkiud. Nende parameetrite paika saamisel sünteesiti vildile ka PPy kiht ning seejärel lihviti sünteesi meetodikat seni kuni soola kiht oli vildi ja PPy kile vahel võimalikult minimaalne. Lõpptulemusena sooritati süntees järgnevalt:

- 1) Valmistati soola ja solventide lahus.
- 2) Süsinikvilt uputati hetkeks lahusesse.
- 3) Soola lahusega immutatud vilt asetati alusel vaakumahju (Memmert VO 400).
- 4) Vakumeeriti 8 millibaarini.
- 5) Vilt asetati eelnevalt 50° C-ni soojendatud klaasist petri tassi keskel olevale salvrätiku tükile.
- 6) Petri tassi sisemisse äärde tilgutati 1 ml Py monomeeri ja seejärel 1 ml isopropüülalkoholi.
- 7) Petri tassile asetati tihendiks DuraSeal<sup>TM</sup> kattekile (vältimaks aurude välja pääsemist) ja seejärel petri tassi kaas.
- 8) Temperatuuri ühtlustamiseks kaeti petri tass alumiinium fooliumiga ja salvrätikutega.
- 9) Vilti hoiti petri tassis 50° C juures 1 h.
- 10) Lisati 1 ml Py monomeeri ja 1 ml isopropüülalkoholi
- 11) Vilti hoiti veel 1 h 50° C juures.
- 12) Vilti pesti ultrapuhta veega (MilliQ+) ja seejärel kuivatati vaakumahjus.

Visuaalselt kinnitust saanud kolme parimat PPy-modifitseeritud vilti võrreldi lämmastikhappes töödeldud vildiga kasutades tsüklilist voltamperomeetriat

(2 mV/s, -0,5V – 0,5 V, Ag/AgCl 3 M NaCl, 5 tsüklit).

## 2.6 Tsükliline voltamperomeetria metoodika

Uuritavaid materjale kasutati tööelektroodina ühekambrilises kolme elektroodiga elektrookeemilises mõõterakus, kus grafiitpulk oli abielektroodiks. Elektroodid sukeldati 0.1 M HCl lahusesse. Mõõtmiseks kasutati potentsiostaati (PARSTAT 2273) ja potentsiaali mõõdeti võrdluselektroodi (Ag/AgCl, 3 M NaCl) suhtes laotuskiirusega 2 mV/s, vahemikus -0,5 V kuni 0,5 V (5 tsüklit).

## 2.7 PPy-modifitseeritud süsinikvildi skaneeriv elektronmikroskoopia

Polüpürrool-süsinik vilt komposiit pesti ultrapuhta veega (Milli-Q+) ja kuivatati vaakumahjus (Memmert VO 400). Kuivatatud proove lõigati skalpelliga ning vaadati ja pildistati skaneeriva elektronmikroskoobiga (Hitachi TM3000).

## 2.8 Katoodi valmistamine

MKE katoodi valmistamiseks pürolüüsisiti 100% puuvillane teksariie. Söestamiseks kasutati toruahju (Carbolite MTF 12/38/400), mille keraamilisse südamikku sisestati kvartsist toru koos rulli keeratud 10x17cm teksariide tükiga. Toruahjust voolas pidevalt läbi lämmastik kiirusel 0,0135 liitrit minutis. Automaatprogramm tõstis temperatuuri 5° C minutis, kuni 1000° Cni, kus hoiti temperatuuri 1 tund. Pärast programmi lõppemist võimaldati ahjul jahtuda ning seejärel eemaldati söestatud riie. Järeltöötlusena pesti riidet korduvalt ultrapuhta veega (Milli-Q+) ja kuivatati vaakumahjus kahe klaasplaadi vahel. Riide pindtakistuseks mõõdeti nelja punkti meetodil (Guardian SRM-232) 2,9  $\Omega$ /ruudu kohta.

## 2.9 MKE kokkupanek ja steriliseerimine

MKE katses testiti 0.3 M Py üheastmelist hüdrogeeli, 0.4 M Py kaheastmelist hüdrogeeli, süsinikvilti paksusega 1.27 cm (Pan Felt Graphite, Ceramaterials), PPy-modifitseeritud süsinikvilti (Vilt\_Ppy\_1) ja süsinikriidet 4 g/m<sup>2</sup> (R&G Faserverbundwerkstoffe GmbH – Kohlefaservlies). Viltidesse punuti titaan traadist kollektor. Hüdrogeelid sünteesiti anoodi kambrisse, kuhu oli eelnevalt paigutatud titaan traadist punutud kollektor (Pilt X.). Süsinikriide kontakti loomiseks toodi anoodi kambrist läbi kummikorgi süsinikriide riba. Eelnevalt pestud MKE komponendid pihustati 70% etanooli lahusega ja pandi kokku vastavalt konstruktsiooni joonisele (**Joonis 6.**). Hüdrogeelide ja viltide MKE-de kokkupanekuks kasutati vesivanni, mis oli täidetud ultrapuhta veega (Milli-Q+), et vältida õhu sattumist kütuseelemendi. Steriliseerimiseks otsustati kasutada 70% etanooli lahust, kuna hüdrogeelide autoklaavimisel esines eelnevalt probleeme (lahusti osalise aurustumise tõttu kuivasid hüdrogeelid osaliselt kokku). MKE-d täideti 70% etanooli lahusega ning lasti seista ~30 minutit. Seejärel paigutati MKE külge mikrofilter (Sartorius Stedim Biotech, Minisart® high flow Syringe Filter, 0,20  $\mu$ m) ja pumbati peristaltilise pumbaga (Ismatec Reglo ICC) etanooli lahuse asemele ultrapuhas vesi (Milli-Q+). Vett vahetati 3 korda ~30 minuti järel. Peale seda pumbati MKE-desse LB sööde ning seejärel inokuleeriti *Shewanella oneidensis* MR-1-ga.

## **2.10 MKE inokulatsioon**

MKE katsete jaoks suspendeeriti ühest bakterist välja arenenud koloonia LB söötmes ja kasvatati 30° C ja 160 rpm'i juures 8 tundi. Pärast kasvatamist mõõdeti lahuse optiline tihedus (GE Ultrospec 7000) 600nm juures ja lahjendati 0,05 A - ni. Igasse MKE-sse süstiti steriilse süstlaga läbi kummi korgi 1 ml baktereid sisaldavat söödet. Seejärel ühendati anood ja katood 1 K $\Omega$  takistiga.

## **2.11 MKE Mõõtmismetoodika**

Erineva anoodi materjaliga MKE-sid karakteriseeriti polarisatsiooni eksperimendiga järgnevalt:

- 1) Avati MKE-de elektriahelad 24 tunniks, et kütuseelemendid saavutaksid oma maksimaalse TJP.
- 2) MKE ühendati takistusmagasini ja mõõtesüsteemiga (National Instrument SC-2345, LabView) .
- 3) Pinged registreeriti 1 sekundi tagant.
- 4) Takistusmagasini opereeriti käsitsi ja takistusi muudeti 30 sekundi järel järgnevalt: 10K, 9K, ..., 1k, 900, 800, ..., 100, 90, 80, ..., 10 oomi.
- 5) LabView programm mõõtis pinget
- 6) Vool ja võimsus arvutati kasutades Ohmi seadust ja võrrandit (17).

## **2.12 Mikroorganismide visualiseerimine**

### **2.12.1 PPy-hüdrogeeli visualiseerimine**

Polüpürrol-hüdrogeel on musta värvusega läbipaistmatu geeljas materjal, mille otsene visualiseerimine läbivalgustava mikroskoobiga on võimatu. Materjali karakteriseerimine SEM-ga peale superkriitilist süsinikdioksiidi ekstraktsiooni on võimalik, kuid töötlemise käigus võib materjali struktuur muutuda (materjali pundumine). Samuti ei ole superkriitilne süsinikdioksiidi ekstraktsioon kõige parem meetod uurimaks materjali koos mikroorganismide kolooniaga. Geeli visualiseerimiseks otsustati kasutada teist lähenemist, sest eelkõige sooviti kindlaks teha, kas bakterid on võimelised kasvama hüdrogeeli sisse.

### **2.12.1.1 PPy-hüdrogeeli viilutamine mikrotroomiga**

Aerogeelid (0.1M ja 0.4M Py) ja hüdrogeel (0.4M Py) (~1 cm<sup>3</sup>) pandi katseklaasidesse koos 5 ml LB söötmega. Steriliseerimiseks autoklaaviti proove 121° C juures 20 minutit. Peale autoklaavimist külvati lahusesse *Escherichia coli* bakterit. Lahustel lasti seista toatemperatuuril 1 nädal ning seejärel eemaldati lahus ja proovid fikseeriti 4% paraformaldehüüdi (PFA) fosfaat-puhverdatud soolalahuses (PBS) 24h. Pärast fikseerimist vahetati PFA lahus astmeliselt (50-60-70-80-90-100%) etanooli vastu. Erineva kontsentratsiooniga etanooli lahuseid vahetati 1 tunni möödudes 2 korda ja 100% etanooli 3 korda. Seejärel vahetati etanool ksüleen vastu 3\*1h. Ksüleen vahetati parafiini vastu (56-58° C) 2\*2h. Saadud parafiini kuubikud viilutati mikrotroomiga (Microm HM 200 Ergostar) 5 µm lõikudeks ja asetati mikroskoobi klaasidele (Thermo Scientific, Polysine® slides) ning fikseeriti soojendatud alusel.

### **2.12.1.2 Visualiseerimine fluorestsentsmikroskoobiga**

Mikrotroomiga lõigatud viilud töödeldi järgnevalt:

- Ksüleen - 20 min
- Etanool 100% - 2 \* 15 min
- Etanool 90% - 5 min
- Etanool 80% - 5 min
- Etanool 70% - 5 min
- Etanool 60% - 5 min
- Etanool 50% - 5 min
- Destilleeritud vesi
- PBS x 1 – 3 \* 5min
- + SYTO® 9 (rohelist fluorestseeruv värvaine)

Peale SYTO® 9 lisamist kaeti viilud katteklaasiga, mille ääred fikseeriti küünelakiga. Peale küünelaki kuivamist vaadati ja pildistati proove fluorestsentsmikroskoobiga (Nikon Eclipse TS100, Intensilight C-HGFI).

### **2.12.1.3 Visualiseerimine skaneeriva elektronmikroskoobiga (SEM)**

Mikrotroomiga lõigatud viilud töödeldi järgnevalt:

- Ksüleen - 20 min

- Etanool 100% - 2 \* 15 min
- Etanool 90% - 5 min
- Etanool 80% - 5 min
- Etanool 70% - 5 min
- Etanool 60% - 5 min
- Etanool 50% - 5 min
- Destilleeritud vesi
- Kuivatati 3h vaakumahjus
- Kaeti 5 nm kullakihi (Leica EM ACE600)

Kullatud proove vaadati ja pildistati skaneeriva elektronmikroskoobiga (Hitachi TM3000).

### 3 TULEMUSED JA ANALÜÜS

#### 3.1 PPy-hüdrokeeli sünteeside ja läbivoolu katsed

Vastavalt eelmises peatükis kirjeldatud metoodikatele, viidi läbi 12 erinevat sünteesireaktsiooni. Kõikide sünteeside ja läbivoolu katsete tulemused on esitatud tabelis 3. Tärnidega (\*) on tähistatud sünteesid, mida korrati 2-4 korda ja läbivoolu tulemused on keskmistatud.

**Tabel 3. PPy-hüdrokeeli sünteeside ja läbivoolu katsete tulemused**

Ppy / APS / DBS konsentratsioon (M)	Kokku (ml)	Valmistamise meetod	Geelistunud	1 pesu (ml/h)	2 pesu (ml/h)
0.1 / 0.1 / 0.1	5	Üheastmeline	+	0,92	0,05*
0.2 / 0.2 / 0.1	5	Üheastmeline	+	0,12	0,05*
0.2 / 0.2 / 0.1	5	Üheastmeline 0°C	+	0,11	0,05
0.2 / 0.2 / 0.1	5	Üheastmeline ultrahelivannis	dispersioon	-	-
0.3 / 0.3 / 0.1	5	Üheastmeline	+	0,20	0,20*
0.3 / 0.3 / 0.1	5	Üheastmeline 0°C	+	0,51	1,74**
0.4 / 0.4 / 0.1	5	Üheastmeline	+	0,20	0,20*
0.4 / 0.4 / 0.1	5	Üheastmeline 0°C	+	0,41	1,74**
1) Sum 0.1 / 0.1 / 0.1 2) Sum 0.3 / 0.5 / 0.1	5	Kaheastmeline (esimene etapp 30s/300s/3h)	dispersioon	-	-*
1) Sum 0.1 / 0.1 / 0.1	5	Kaheastmeline	dispersioon	-	-**



2) Sum 0.7 / 0.9 / 0.1		(esimene etapp 30s/300s/3h)			
1) Sum 0.8 / 0.075 / 0.075	5	Kaheastmeline (esimene etapp 3h)	+	2,26	2,98***
2) Sum - / 0.925 / 0.125					
1) Sum 0.4 / 0.075 / 0.075	5	Kaheastmeline (esimene etapp 3h)	+	~3600	~3600***
2) Sum - / 0.425 / 0.05					

Läbivoolukatsete tulemused viitasid sellele, et üheastmeliselt sünteesitud hüdrogeelis olevad tühimikud (**joonis 7.**), ei ole omavahel väga hästi ühenduses. Sellest tulenevalt võib järeldada, et bakterite liikumine materjalis on raskendatud ja isegi kui ajajooksul materjal täituks rikkaliku bakteri kolooniaga, siis toitainete difusioon materjali sisemusse on aeglane. Üheastmeliste geelide katsetest oli näha, et madala PPy kontsentratsiooniga (0.1 M ja 0.2 M) hüdrogeelid on struktuurset nõrgad ning vajuvad veesamba rõhu all kokku ja seetõttu aeglustub ka läbivoolu kiirus. Väga huvitav tulemus oli see, et 0°C juures sünteesitud kõrgema kontsentratsiooniga (0.3 M ja 0.4 M) hüdrogeelid omasid paremat läbivoolu kiirust kui toatemperatuuril sünteesitud hüdrogeelid ja see kasvas veelgi peale esimest läbivoolu. See võib viidata sellele, et 0°C juures sünteesitud hüdrogeelide sisemusse tekib sünteesi käigus struktuuriga nõrgalt seotud või isegi täiesti lahtiseid oligomeere ja ristsidumata lühikesi PPy-ahelaid, mis läbivoolu käigus maatriksist välja uhutakse.

Töö käigus tehti korduva katsetusi saavutamaks kaheastmeline hüdrogeeli süntees. Enamasti saadi tulemuseks vedel PPy dispersioon. Õnnestunud kaheetapilised hüdrogeelid omasid palju paremat läbivoolu kui üheetapilised hüdrogeelid. See tuleneb sellest, et struktuuris esinevad sünteesi esimeses etapis tekkinud ja seejärel mehaaniliselt lõhutud geeli subühikud, millest osad esimese läbivoolu käigus välja uhutakse. Kõige parema läbivooluga kaheetapilisel hüdrogeelil oli üks probleem, mis seisnes selles, et vesi voolas hüdrogeelist kiiresti välja ja geel tõmbus kokku. Paari sekundi jooksul võib hüdrogeel kaotada poole oma ruumalast ja sellest tulenevalt on antud geeli käistlemine raskendatud.

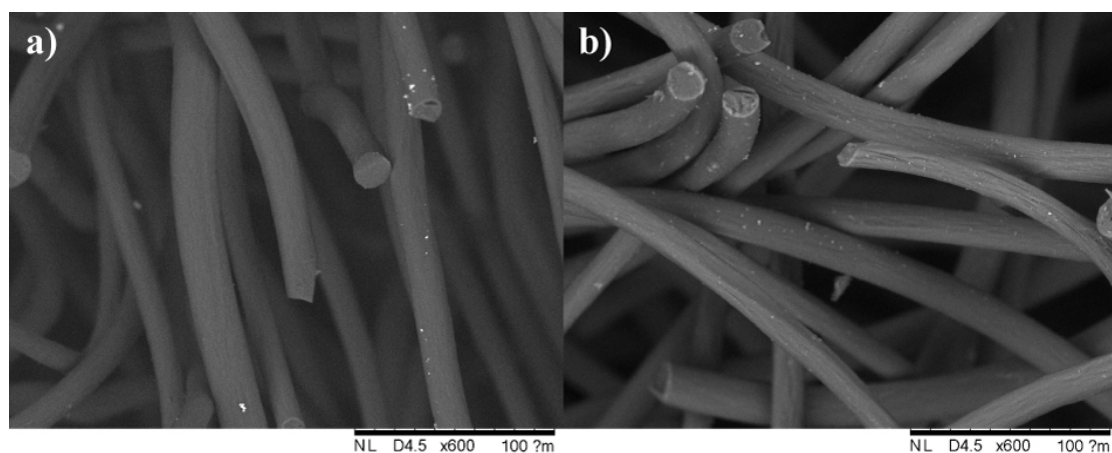
### 3.2 PPy-modifitseeritud süsinikviltide süntees

Soolakihi sadestamiseks katsetatud soolade ja solventide kontsentratsioonid on välja toodud tabelis (Tabel 4.).

**Tabel 4. Soolakihi sadestamiseks kasutatud soolade ja solventide kontsentratsioonid**

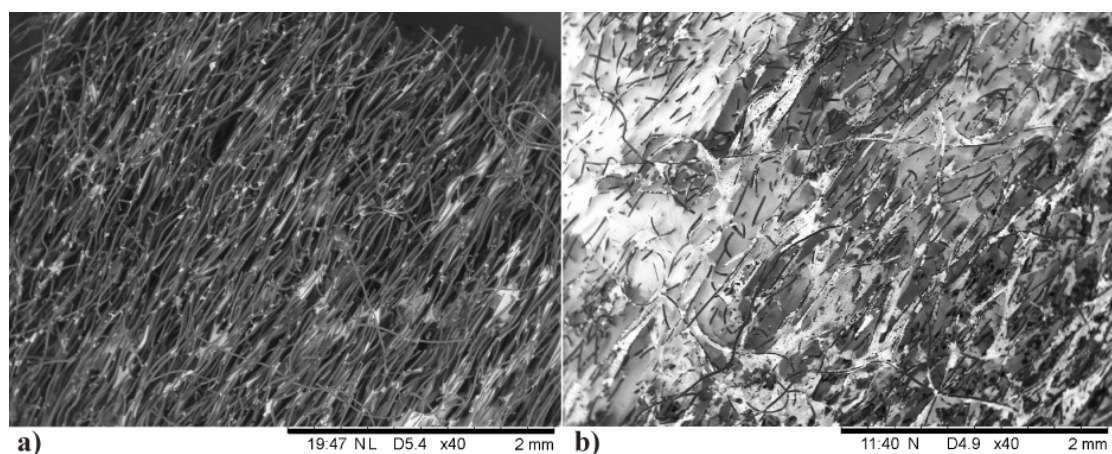
Solvent	Solvendi vahekord	Soolad	Kontsentratsioon	Tulemus
H <sub>2</sub> O	1/1	FeCl <sub>3</sub>	0.5 M	Ainult kiudude ristumiskohtades
Propüleenkarbonaat	1/1	FeCl <sub>3</sub>	0.5 M	Ainult kiudude ristumiskohtades
Isopropüülalkohol	1/1	FeCl <sub>3</sub>	0.5 M	Pisut ka kiudude keskel
Isopropüülakohol/ H <sub>2</sub> O	1/1	FeCl <sub>3</sub>	0.5 M	Pisut ka kiudude keskel
Isopropüülakohol/ H <sub>2</sub> O	1/3	FeCl <sub>3</sub>	0.5 M	Pigem kiudude ristumiskohtadel
Isopropüülakohol/ H <sub>2</sub> O	3/1	FeCl <sub>3</sub>	0.5 M	Pisut ka kiudude keskel
H <sub>2</sub> O	1/1	FeCl <sub>3</sub> / POM	0.5 / 0.025 M	Liiga palju soola igal pool
H <sub>2</sub> O	1/1	FeCl <sub>3</sub> / POM	0.25 / 0.0125 M	Liiga palju soola igal pool
H <sub>2</sub> O	1/1	FeCl <sub>3</sub> / POM	0.125 / 0.006 M	Õiges suunas
Isopropüülakohol/ H <sub>2</sub> O	3/1	FeCl <sub>3</sub> / POM	0.18 / 0.006 M	Palju soola
Isopropüülakohol/ H <sub>2</sub> O	1/1	FeCl <sub>3</sub> / POM	0.16 / 0.006 M	Pisut palju soola
Isopropüülakohol/ H <sub>2</sub> O	1/1	FeCl <sub>3</sub> / POM	0.14 / 0.006 M	Pisut palju soola
Isopropüülakohol/ H <sub>2</sub> O	1/1	FeCl <sub>3</sub> / POM	0.12 / 0.006 M	+ PPy_Vilt_1

Isopropüülakohol/ H <sub>2</sub> O	3/1	FeCl <sub>3</sub> / POM	0.12 / 0.006 M	+ PPy_Vilt_2
Isopropüülakohol/ H <sub>2</sub> O	3/1	FeCl <sub>3</sub> / POM	0.1 / 0.005 M	+ PPy_Vilt_3

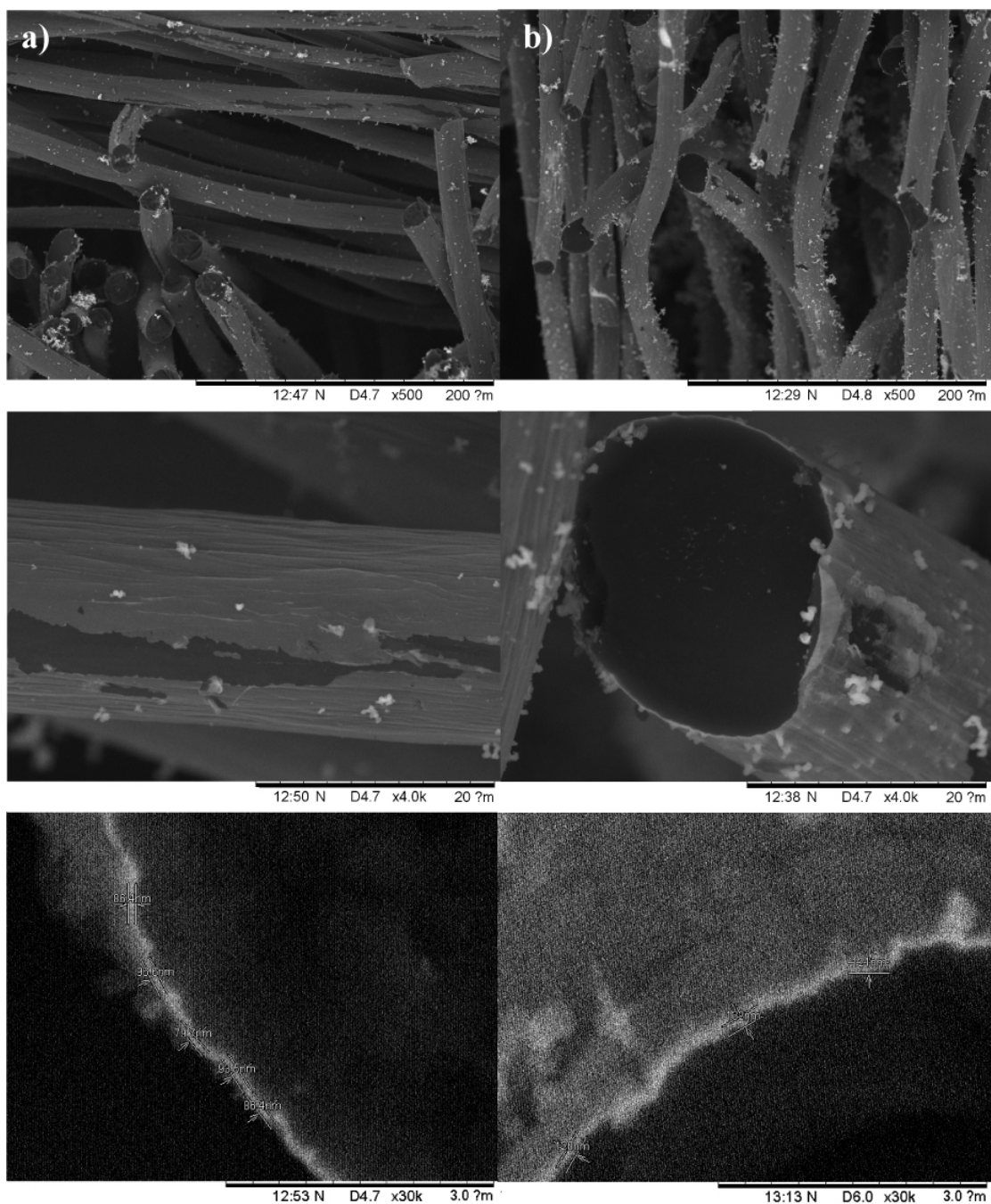


**Joonis 9. SEM mikrograaf a) töötlemata vildi kiudude struktuur ja b) 24h lämmastikhappega töödeldud vildi kiudude pinnastruktuur**

Joonisel 9. on välja toodud tavalise vildi pinnastruktuur (a) võrreldes 24h lämmastikhappega töödeldud vildi pinnastruktuuriga (b). Piltidelt on selgelt näha, et lämmastikhappega töödeldes muutub süsinikvildi kiud palju struktuursemaks. Joonisel 10. on näha tulemusi, mis vastavad ebaõnnestunud katmisele (soola kontsentratsioonide ja solventide vahekord ei ole optimaalne).



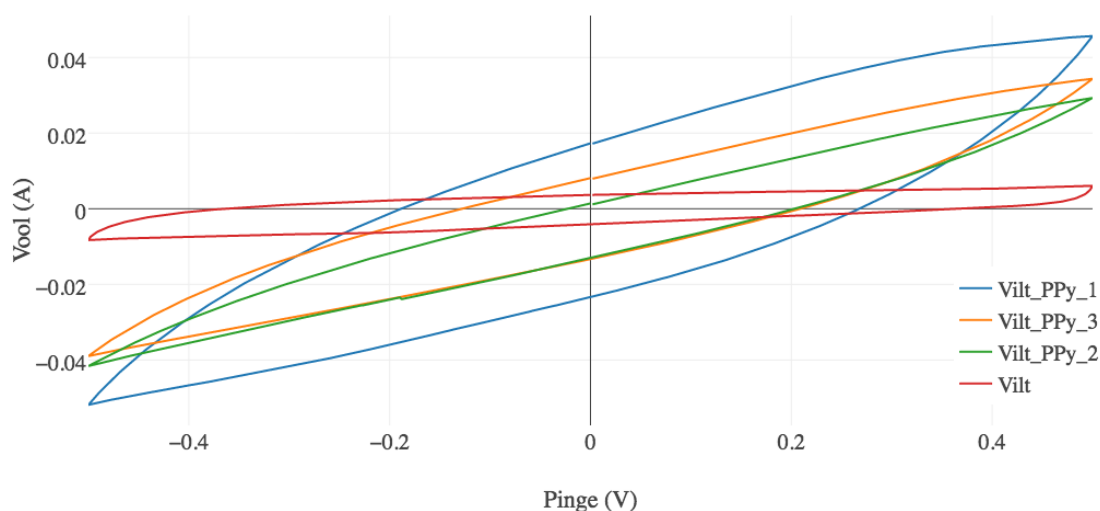
**Joonis 10. SEM mikrograafid a) 0.5 M FeCl<sub>3</sub> - H<sub>2</sub>O sadestus b) 0.5 M FeCl<sub>3</sub> ja 0.025 M POM - H<sub>2</sub>O sadestus**



**Joonis 11. SEM mikrograafid: tulp a) PPy\_Vilt\_1 - 0.12 M FeCl<sub>3</sub> ja 0.006 M POM – Isopropüülalkohol / H<sub>2</sub>O (1/1), tulp b) PPy\_Vilt\_3 - 0.1 M FeCl<sub>3</sub> ja 0.005 M POM – Isopropüülalkohol / H<sub>2</sub>O (3/1)**

Joonisel 11. tulpades a ja b on välja toodud süsinikvildi modifitseerimise katsetes kõige ühtlasema ja õhema PPy/soola kihiga modifitseeritud vildid. PPy\_Vilt\_1 PPy/soola kihi paksus jäi vahemikku 79,7 – 93,5 nm, PPy\_Vilt\_2 korral jäi see vahemikku 130 – 143 nm ja PPy\_Vilt\_3 puhul jäi see vahemikku 120 – 132 nm. Skalpelliga lõigates vigastati PPy/soola kihti, mis aitab esile tuua süsinikkiudude katmise ühtluse.

### 3.3 PPy-modifitseeritud süsinikviltide elektrokeemiliste omaduste võrdlus



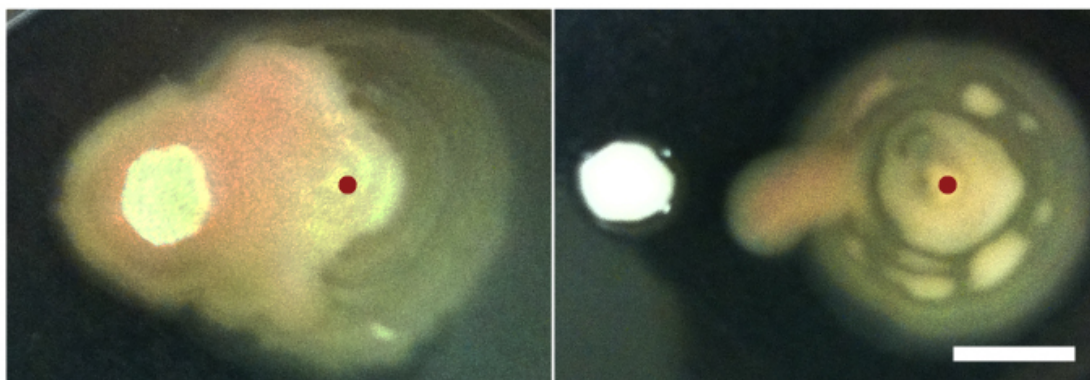
Graafik 1. Tsüklilise voltamperomeetria graafikud erinevatele viltidele

Katses võrreldi kolme kõige paremat PPy-modifitseeritud süsinikvilti  $\text{HNO}_3$  töödeldud süsinikvildiga. Graafikult 1. on selgelt näha, et õhukese PPy kile sadestamisel süsinikvildile, kasvab selle mahtuvus märgatavalt. Kõige suurem on mahtuvuse kasvu efekt kõige õhema PPy kihiga – PPy\_Vilt\_1 korral. Õhuke kiht on optimaalne, sest soola ja PPy kile sadestamise tagajärjel kasvab samas ka materjali takistus.

### 3.4 Kemotaksise katsed

Kemotaksise katsest anaeroobsetes tingimustes oli selgelt näha, et *Shewanella oneidensis* MR-1 koloonia orienteerib ennast raud(III)tsitraadiga immutatud filterpaberi suunas (**joonis 12.**). Eesmärgile lähenedes ja kokkupuutel oli märgata bakterite tiheduse kasvu, kuna lõheroosakas värvus on omane rikkalikule MR-1 kolooniale. See viitab sellele, et *S. oneidensis* on võimalik meelitada anaeroobsetes tingimustes kolmedimensiooniliste elektroodide sisse, ning samas ka võimendada koloonia arengut.

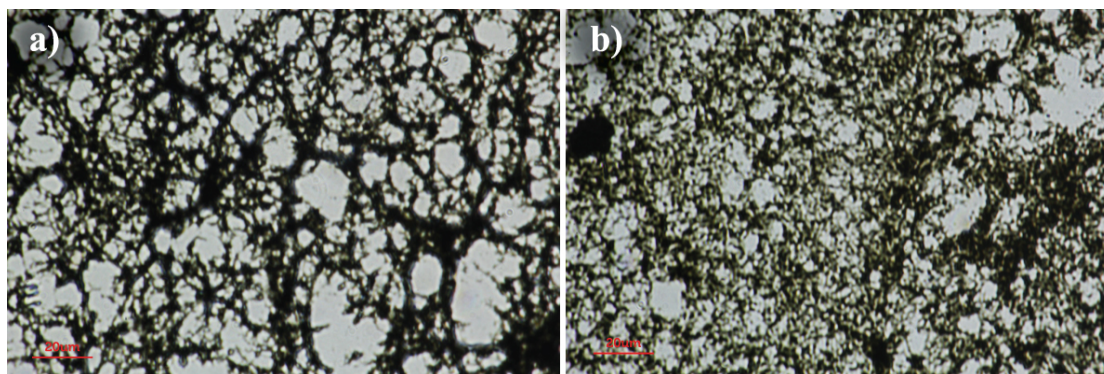




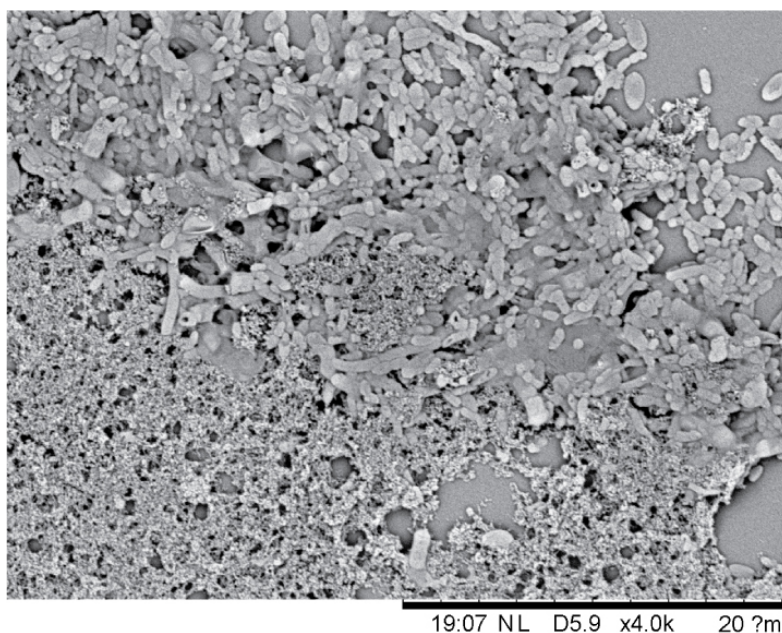
**Joonis 12.** *Shewanella oneidensis* MR-1 koloonia liikumine raud(III)tsitraadiga immutatud filterpaberi suunas (mõõteriba - 1 cm)

### 3.5 Mikrotoomiga viilutatud PPy-hüdrogeeli visualiseerimine

Mikrotoomiga PPy-hüdro- ja aerogeelide viilutamine andis täiesti uue ettekujutuse geelide struktuurist. Jooniselt 13. on selgelt näha, et seni kasutatud superkriitilist CO<sub>2</sub> ekstraktsiooni rakendades geeli struktuur muutub (pundub) ning sellest tulenevalt ei ole see kõige parem meetod PPy-hüdrogeelide struktuuri ja ristlõigete uurimiseks. Mikrotoomiga lõigatud viile on võimalik vaadata ka skaneeriva elektronmikroskoobiga (**Joonis 14.**). Koos bakteritega vaatamiseks tuleb viilud eelnevalt vaakumahjus kuivatada ja seejärel katta ioontolmustiga õhukese kulla kihiga (~3-5 nm).

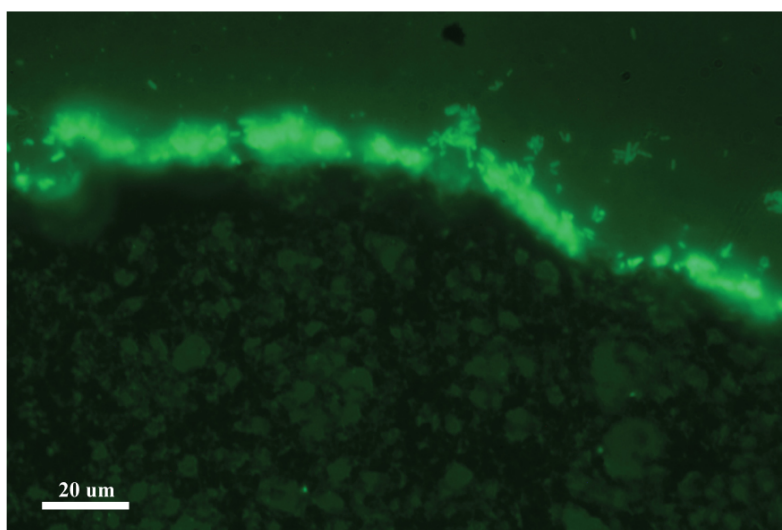


**Joonis 13.** Läbivalgustava mikroskoobi pildid: a) 0.4 M PPy-hüdrogeel b) 0.4 M PPy-aerogeel



**Joonis 14. SEM mikrograad 0.4 M PPy-aerogeelist koos bakteri kolooniaga**

Kasutades fluorestsentsmikroskoopi PPy-hüdro- ja aerogeelide uurimiseks bakterite kolooniatega nähti, et bakterid ei ole võimelised kasvama geeli sisemusse (**Joonis 15.**)



**Joonis 15. Fluorestsentsmikroskoobi pilt 0.4 M PPy-hüdrogeelist koos bakteri kolooniaga**

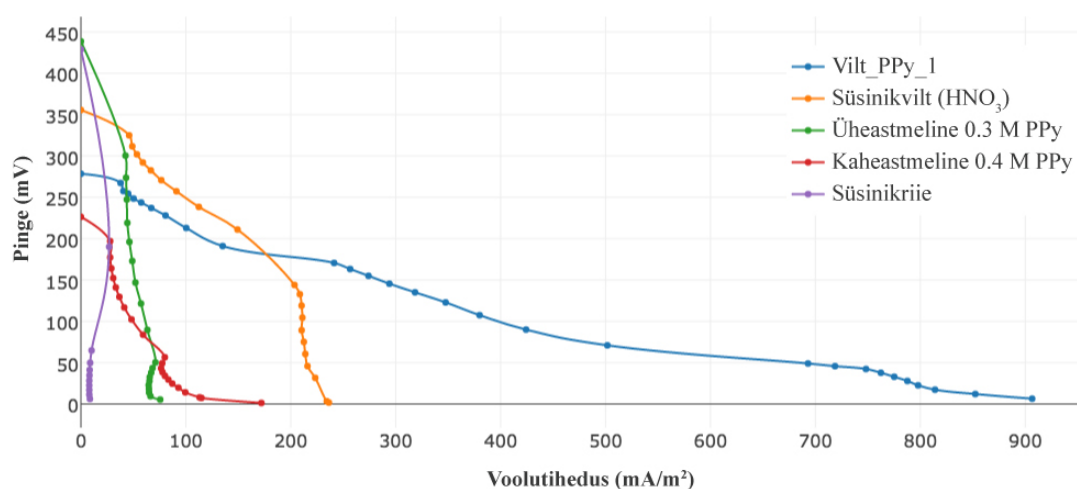
### **3.6 MKE tootlikkuse analüüs**

Käesoleva töö raames läbiviidud katse eesmärgiks ei olnud maksimaalse võimaliku võimsuse ega muude väljapaistvate omaduste püüdmine, vaid erinevate materjalide võrdlemine. Kõik MKE-d olid ühesuguse ülesehitusega, kus varieerus ainult anoodi materjal. Paralleelselt testiti viies MKEs viite erinevat materjali: PPy modifitseeritud

süsinikvilti - Vilt\_PPy\_1, süsinikvilti ( $\text{HNO}_3$  töödeldud), üheastmelist 0.3 M PPy-hüdrokeeli, kaheastmelist 0.4 M PPy-hüdrokeeli ja süsinikriiet. MKE-de käivitumisel hakkas kõige esimesena tulemusi näitama süsinikriie ja temale järgnes koheselt  $\text{HNO}_3$  töödeldud vilt. Alles nädala möödudes hakkas Vilt\_PPy\_1 MKE näitama sarnaseid tulemusi. See oli arvatavasti tingitud sellest, et bakteritel oli võimalik elektrone loovutada PPy-kihi alt immitsevatele  $\text{Fe}^{3+}$  ionidele. Hüdrogeelide reaktorites oli esimestel nädalatel ja söötmete vahetamisel bakteriaalne kasv osaliselt inhibeeritud. See võis tuleneda sellest, et geelist eritus dodetsüülbenseenisulfonaadi ioone, mis võivad bakteriaalset arengut inhibeerida. Samuti võis geel sisaldada etanooli jälgi, mis jäid sinna MKE steriliseerimise käigus. Pideva voolu genereerimisel fikseeritud takistusel 1  $\text{K}\Omega$  saavutasid MKE-d järgnevad pinge maksimumid:

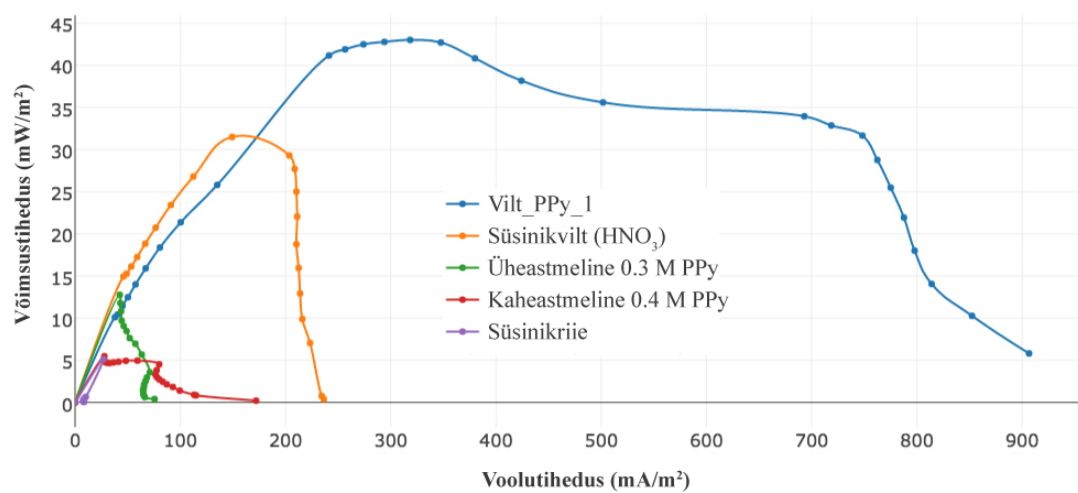
- 1) Vilt\_PPy\_1 – 101,6 mV
- 2) Süsinikvilt ( $\text{HNO}_3$ ) – 62,4 mV
- 3) üheastmelist 0.3 M PPy-hüdrokeel – 26,4 mV
- 4) 0.4 M PPy-hüdrokeel – 18,9 mV
- 5) Süsinikriie – 11,6 mV

Söötme vahetamisel süsinikriide MKE pinge langes ~1,5 millivoldini, mis viitab sellele, et materjali väikse eripinna tõttu domineeris MKE-s mediaatorite vahendusel toimuv elektronide ülekanne. Teiste MKE-de puhul ei olnud hetkeline pingelangus nii drastiline (~1 – 4 mV). MKE-de polarisatsiooni eksperimentis saavutas ülekaalukalt parema tulemuse PPy-modifitseeritud süsinikvilt (**Graafikud 2. ja 3.**).



**Graafik 2. MKE-de polarisatsiooni kõverad**





**Graafik 3. MKE-de võimsustihedused sõltuvalt voolutihedustest**

## KOKKUVÕTE

Käesoleva uurimistöö algseks eesmärgiks oli sünteesida ja uurida erinevaid polüürrool-hüdrogeele ning katsetada neid esimest korda mikrobioloogilistes kütuseelementides. Eelkatsed, mida antud töös mahupiirangute tõttu ei käsitleta, näitasid, et PPy-hüdrogeel ei pruugi olla kõige parem materjal antud rakenduseks, sest geeli struktuuri tühimikud ei ole piisavalt omavahel ühenduses. Sellest tulenevalt otsustati hüdrogeelide katsetamisele lisaks kasutada polüürrooli süsinikmaterjalide omaduste parandamiseks ning katsetada saadud komposiite mikrobioloogilistes kütuseelementides. Käesoleva magistritöö laiahaardelise eksperimentaalse töö tulemusena on saavutatud alljärgnevad eesmärgid:

- 1) Erinevate üheastmeliste hüdrogeelide sünteesimine ja läbivoolu uurimine.
- 2) Kaheastmelise hüdrogeeli sünteesi meetodika väljatöötamine.
- 3) Kolmedimensioonilise geelja materjali ristlõike uurimismetoodika väljatöötamine.
- 4) PPy-modifitseeritud süsinikvildi sünteesi meetodika väljatöötamine.
- 5) PPy-modifitseeritud süsinikvildi karakteriseerimine.
- 6) PPy-hüdrogeelide ja PPy-modifitseeritud süsinikvildi katsetamine mikrobioloogilise kütuseelemendi anoodimaterjalina.

Sünteesitud PPy-süsinikvilt komposiit osutus teistest proovitud materjalidest ülekaalukalt paremaks anoodimaterjaliks, andes kõrgematel voolutihendustel nii suurima pinge kui enim võimsust. Lisaks on loodud katmismetoodikat ilmselt võimalik kasutada ka teiste süsinikmaterjalide katmiseks ja muudes rakendustes.

Saadud tulemused lubavad soovitada ka mikrobioloogiliste kütuseelementide kolmedimensioonilistes bioelektroodides osaliselt kapseltatud kemo- või energia taksisega seostatud ainete kasutamist.

## KASUTATUD KIRJANDUSE LOETELU

- [1] Pison, G. The Population of the World ( 2015 ). Population & Societies, **525** (2015), <https://www.ined.fr/en/publications/population-and-societies/the-population-of-the-world-2015/>
- [2] McCarty, P. L., Bae, J. & Kim, J. Domestic wastewater treatment as a net energy producer - can this be achieved? Environ. Sci. Technol. **45**, 7100–6 (2011).
- [3] Logan, B. E. Extracting Hydrogen and Electricity from Renewable Resources. Environ. Sci. Technol. **38**, 160A–167A (2004).
- [4] Perlack, R. D. et al. Biomass as Feedstock for a Bioenergy and Bioproducts Industry: the Technical Feasibility of a Billion-ton Annual Supply (Oak Ridge National Laboratory, 2005).
- [5] Logan, B. E. Exoelectrogenic bacteria that power microbial fuel cells. Nat. Rev. Microbiol. **7**, 375–381 (2009).
- [6] Lalaurette, E., Thammannagowda, S., Mohagheghi, A., Maness, P.-C. & Logan, B. E. Hydrogen production from cellulose in a two-stage process combining fermentation and electrohydrogenesis. Int. J. Hydrogen Energy **34**, 6201–6210 (2009).
- [7] Lu, L., Ren, N., Xing, D. & Logan, B. E. Hydrogen production with effluent from an ethanol-H<sub>2</sub>-coproducing fermentation reactor using a single-chamber microbial electrolysis cell. Biosens. Bioelectron. **24**, 3055–3060 (2009).
- [8] Kim, Y. & Logan, B. E. Hydrogen production from inexhaustible supplies of fresh and salt water using microbial reverse-electrodialysis electrolysis cells. Proc. Natl Acad. Sci. USA **108**, 16176–16181 (2011).
- [9] Kim, Y. & Logan, B. E. Microbial reverse electrodialysis cells for synergistically enhanced power production. Environ. Sci. Technol. **45**, 5834–5839 (2011).
- [10] Hoogers, G. Fuel Cell Technology Handbook. (Boca Raton, FL: CRC Press, 2003)

- [11] Barbir, F. PEM Fuel Cells: PEM Fuel Cells: Theory and Practice. Burlington, MA: Elsevier, Inc. (2013).
- [12] Min, B. & Logan, B. E. Continuous electricity generation from domestic wastewater and organic substrates in a flat plate microbial fuel cell. *Environ. Sci. Technol.* **38**, 5809–5814 (2004).
- [13] Liu, H. et al. Production of electricity during wastewater treatment using a single chamber microbial fuel cell. *Environ. Sci. Technol.* **38**, 2281–5 (2004).
- [14] Min, B., Kim, J., Oh, S., Regan, J. M. & Logan, B. E. Electricity generation from swine wastewater using microbial fuel cells. *Water Res.* **39**, 4961–4968 (2005).
- [15] Santoro, C. et al. Current generation in membraneless single chamber microbial fuel cells (MFCs) treating urine. *J. Power Sources* **238**, 190–196 (2013).
- [16] Greenman, J., Gálvez, A., Giusti, L. & Ieropoulos, I. Electricity from landfill leachate using microbial fuel cells: Comparison with a biological aerated filter. *Enzyme Microb. Technol.* **44**, 112–119 (2009).
- [17] Santoro, C., Lei, Y., Li, B. & Cristiani, P. Power generation from wastewater using single chamber microbial fuel cells (MFCs) with platinum-free cathodes and pre-colonized anodes. *Biochem. Eng. J.* **62**, 8–16 (2012).
- [18] Kiely, P. D., Rader, G., Regan, J. M. & Logan, B. E. Long-term cathode performance and the microbial communities that develop in microbial fuel cells fed different fermentation endproducts. *Bioresour. Technol.* **102**, 361–366 (2011).
- [19] Sharma, Y., Parnas, R. & Li, B. Bioenergy production from glycerol in hydrogen producing bioreactors (HPBs) and microbial fuel cells (MFCs). *Int. J. Hydrogen Energy* **36**, 3853–3861 (2011).
- [20] Logan, B. E. et al. Microbial fuel cells: Methodology and technology. *Environ. Sci. Technol.* **40**, 5181–5192 (2006).
- [21] Gregory, K. B., Bond, D. R. & Lovley, D. R. Graphite electrodes as electron donors for anaerobic respiration. *Environ. Microbiol.* **6**, 596–604 (2004).

- [22] Clauwaert, P. et al. Biological denitrification in microbial fuel cells. *Environ. Sci. Technol.* **41**, 3354–3360 (2007).
- [23] Dumas, C., Basseguy, R. & Bergel, A. Microbial electrocatalysis with *Geobacter sulfurreducens* biofilm on stainless steel cathodes. *Electrochim. Acta* **53**, 2494–2500 (2008).
- [24] Strycharz, S. M. et al. Graphite electrode as a sole electron donor for reductive dechlorination of tetrachlorethene by *Geobacter lovleyi*. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 5943–5947 (2008).
- [25] You, S., Zhao, Q., Zhang, J., Jiang, J. & Zhao, S. A microbial fuel cell using permanganate as the cathodic electron acceptor. *J. Power Sources* **162**, 1409–1415 (2006).
- [26] Wang, G., Huang, L. & Zhang, Y. Cathodic reduction of hexavalent chromium [Cr(VI)] coupled with electricity generation in microbial fuel cells. *Biotechnol. Lett.* **30**, 1959–1966 (2008).
- [27] Oh, S. & Min, B. Cathode Performance as a Factor in Electricity Generation in Microbial Fuel Cells - Environmental Science & Technology (ACS Publications). **38**, 4900–4904 (2004).
- [28] Logan, B. E. & Regan, J. M. Electricity-producing bacterial communities in microbial fuel cells. *Trends Microbiol.* **14**, 512–518 (2006).
- [29] Logan, B. E. & Regan, J. M. Microbial Fuel Cells—Challenges and Applications. *Environ. Sci. Technol.* **40**, 5172–5180 (2006).
- [30] Gil, G. C. et al. Operational parameters affecting the performance of a mediator-less microbial fuel cell. *Biosens. Bioelectron.* **18**, 327–334 (2003).
- [31] Marsili, E. et al. *Shewanella* secretes flavins that mediate extracellular electron transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 3968–3973 (2008).
- [32] Torres, C. I. et al. A kinetic perspective on extracellular electron transfer by anode-respiring bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **34**, 3–17 (2010).
- [33] Pirbadian, S. et al. *Shewanella oneidensis* MR-1 nanowires are outer membrane and periplasmic extensions of the extracellular electron transport components. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 12883–12888 (2014).

- [34] Reguera, G. et al. Biofilm and nanowire production leads to increased current in *Geobacter sulfurreducens* fuel cells. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 7345–7348 (2006).
- [35] Myers, C. R. & Nealson, K. H. Bacterial Manganese Reduction and Growth with Manganese Oxide as the Sole Electron Acceptor. *Science* (80-. ). **240**, 1319–1321 (1988).
- [36] Gorby, Y. a et al. Electrically conductive bacterial nanowires produced by *Shewanella oneidensis* strain MR-1 and other microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 11358–11363 (2006).
- [37] El-Naggar, M. Y. et al. Electrical transport along bacterial nanowires from *Shewanella oneidensis* MR-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 18127–18131 (2010).
- [38] Mr-, S., Bencharit, S. & Ward, M. J. Chemotactic Responses to Metals and Anaerobic Electron Acceptors in Chemotactic Responses to Metals and Anaerobic Electron Acceptors in *Shewanella oneidensis* MR-1. *J. Bacteriol.* **187**, 5049–5053 (2005).
- [39] B.E. Logan, *Microbial fuel cells* (John Wiley& Sons, New Jersey, 2008).
- [40] Liu, H. & Logan, B. E. Electricity Generation Using an Air-Cathode Single Chamber Microbial Fuel Cell in the Presence and Absence of a Proton Exchange Membrane. *Environ. Sci. Technol.* **38**, 4040–4046 (2004).
- [41] Cheng, S., Liu, H. & Logan, B. E. Increased performance of single-chamber microbial fuel cells using an improved cathode structure. *Electrochem. commun.* **8**, 489–494 (2006).
- [42] Kang, S., Mauter, M. S. & Elimelech, M. Physicochemical Determinants of Multiwalled Carbon Nanotube Bacterial Cytotoxicity. *Environ. Sci. Technol.* **42**, 7528–7534 (2008).
- [43] Wei, B., Tokash, J. C., Chen, G., Hickner, M. A. & Logan, B. E. Development and evaluation of carbon and binder loading in low-cost activated carbon cathodes for air-cathode microbial fuel cells. *Rsc Adv.* **2**, 12751–12758 (2012).

- [44] Zhang, F., Cheng, S., Pant, D., Bogaert, G. Van & Logan, B. E. Power generation using an activated carbon and metal mesh cathode in a microbial fuel cell. *Electrochem. commun.* **11**, 2177–2179 (2009).
- [45] Izallalen, M. et al. *Geobacter sulfurreducens* strain engineered for increased rates of respiration. *Metab. Eng.* **10**, 267–275 (2008).
- [46] Ateh, D. . et al. Polypyrrole-based conducting polymers and interactions with biological tissues. *J. R. Soc. Interface* **3**, 741–752 (2006).
- [47] Temmer, R., Kiefer, R., Aabloo, A. & Tamm, T. Direct chemical synthesis of pristine polypyrrole hydrogels and their derived aerogels for high power density energy storage applications. *J. Mater. Chem. A* **1**, 15216 (2013).

# **Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina, Hans Priks

(sünnikuupäev: 02.10.1987)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose “Polüpürrool mikrobioloogiliste kütuseelementide elektroodimaterjalina”, mille juhendaja on Dr. Tarmo Tamm.
  - 1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
  - 1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, **01.06.2016**